(579

.

•

.

•

- ′

:

94432



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

"DIFERENCIAS EN LA SENSIBILIDAD A LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DE DOSIS BAJAS DE RADIACION IONIZANTE"

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS FARMACEÚTICAS

PRESENTA
GLADYS ANGÉLICA MOSCOSO MUJICA
MATRICULA: 204385933

COMITÉ TUTORIAL

TUTORA: DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET ASESORA: DRA. LAURA CASTRILLÓN RIVERA

ASESOR: DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ

MÉXICO,D.F.

SEPTIEMBRE 2006



"DIFERENCIAS EN LA SENSIBILIDAD A LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DE DOSIS BAJAS DE RADIACION IONIZANTE"

COMITÉ TUTORIAL.

Vo. Bo.

TUTOR: DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET

Lucia 6 Coolailler >
ASESOR: DRA. LAURA CASTRILLÓN RIVERA

ASESOR: DR. PADIO SALAMANCA GÓMEZ

GLADYS ANGÉLICA MOSCOSO MUJICA

MATRICULA: 204385933

"DIFERENCIAS EN LA SENSIBILIDAD A LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DE DOSIS BAJAS DE RADIACION IONIZANTE"

JURADO:

PRESIDENTE: Dr. LUÍS BENÍTEZ BRIBIESCA

VOCAL: Dra. MARÍA ESTER BRANDAN SIQUÉS

SECRETARIO: Dra. LAURA ESTELA CASTRILLÓN RIVERA

Está tesis se realizó en el Laboratorio del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM; bajo la dirección de la Dra. Patricia Ostrosky Sheket, jefa del laboratorio y los asesores Dra. Laura Castrillón Rivera jefa del laboratorio de Inmunopotenciadores en la UAM-X y el Dr. Fabio Salamanca Gómez, jefe de la División de Investigación en Genética Médica, del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Eres lo que tu más profundo

y vigoroso deseo Es.

Como es tu deseo, Es tú voluntad.

Como es tu voluntad, Son tus actos.

Como son tus actos, Es tú destino.

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgencita por iluminar mis pasos con su bendición, por permitirme crecer cada día y saber que nunca estoy sola.

A la memoria de Erick, por su espíritu bondadoso, incansable. Gracias por contagiarme de tu magia, este paso es de los dos.

A mi papi Carlos por confiar en mí, por enseñarme a volar e ir tras mis sueños y saber que siempre cuento contigo. Se que no ha sido fácil para ti hacer que la vida sea tan fácil para mi. Gracias por todo, te adoro.

A mi madrecita Angélica por ser mi guía, por compartir tu vida conmigo, por enseñarme miles de cosas y lo más importante que el amor y la confianza en uno mismo supera todo obstáculo. Mi amor para ti.

A mi mami Gladis por tu fuerza, firmeza, optimismo y en especial por ser como eres, te quiero mucho.

A Pawel más que un hermano eres mi cómplice. Gracias por compartir mis locuras y apoyarme en todo, te admiro y te quiero.

A toda mi familia y amigos, por acompañarme cada día. Sin Uds. seria muy penosa mi existencia. Gracias!!!!. En especial a Ghissela por ser mi hermanita y compartir experiencias inolvidables.



AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

Mi gratitud, admiración y cariño para la Dra. Patricia Ostrosky Shejet por abrir las puertas del laboratorio sin conocerme, por tener toda la paciencia del mundo conmigo, por su asesoria, invalorable aporte intelectual y apoyo brindado con mucha calidad profesional y humana. Que me otorgó el privilegio de compartir experiencias personales y profesionales con un grupo humano excelente.

Agradezco a la Dra. Laura Castrillón y Dr. Fabio Salamanca por sus valiosas sugerencias, apoyo y amistad que me brindaron durante el desarrollo de está tesis.

A la Dra. María Ester Brandan Siqués del Instituido de Física, UNAM y al Dr. Luís Benítez Bribiesca del Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Miembros del jurado, por sus valiosas recomendaciones para está tesis.

De manera muy especial agradezco a C. a Dra. Dorys Mata López por ser mi maestra, enseñarme con mucha dedicación, profesionalismo las técnicas aprendidas y muchas cosas más. Gracias amiga.

Le expreso mi agradecimiento a los Miembros de la Comisión de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas UAM-X, en especial al Coordinador Dr. Tomás Quirino Barreda, por su orientación y apoyo, que refleja el gran ser humano que es.



Especial mención merecen mis amigos del laboratorio de Medicina Genómica Toxicológica y Ambiental: Monsesita, Any, Dorys, Viky, Faty, Ely, Maru, Anita, Andrea, Debby, Horte, Natalia, Paty, Martita, Ayda, Ale, Andrés, Hugo y Erik. Gracias por acogerme con mucha calidez, por sus enseñanzas y apoyo incondicional a nivel profesional y personal. Aprendí que a pesar de estar lejos de casa, podría contar con una familia mexicana.

A todos mis amigos de la UAM-X, con quienes compartí agradables experiencias, que guardaré por siempre en mi corazón.

Al Dr. Angel Mujica, Janice, Zayda, María Jose, Hna. Blanca, Dorys Castañeda, Magda y Olga Defort. En especial a mi amiga del alma Karin, gracias por su amistad y su apoyo.

Al laboratorio de Medicina Genómica Toxicológica y Ambiental del Instituto de Biomédicas de la UNAM, por permitirme utilizar sus instalaciones para desarrollar esta tesis.

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco (UAM-X) por haberme permitido incorporarme a un programa de postgrado de excelencia (Maestría en Ciencias Farmacéuticas) y a los docentes por sus enseñanzas impartidas.

RESUMEN

A la Radiación lonizante (RI) se le clasifica como un agente mutagénico y carcinogénico por los efectos observados a nivel celular, originando mutaciones puntuales y rompimientos cromosómicos en cualquier fase del ciclo mitótico o meiótico e índucción de la transformación de células normales a células cancerosas. Los efectos en la salud ocasionados por las dosis altas de RI están claramente identificados pero los efectos a dosis bajas son difíciles de demostrar y aun continúan en debate

Mediante estudios epidemiológicos, clínicos y técnicas de biología molecular, fue factible caracterizar y asociar a síndromes de tipo hereditario con una predisposición al cáncer originada por la sensibilidad individual a diferentes mutágenos. Uno de estos síndromes es Ataxia Telangiectasia (AT), una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen ATM, caracterizada por presentar ataxia cerebelar progresiva, telangiectasia ocular, inmunodeficiencia, inestabilidad cromosómica, sensibilidad a la RI e incremento en la incidencia de cáncer. La proteína ATM se caracteriza por detectar la señal de la ruptura de la doble hebra del ADN y regular directamente los múltiples caminos de señalización celular para iniciar el mecanismo de reparación. La incidencía de pacientes con AT es 1 en 40 000 a 1 en 300 000 por nacimiento dependiendo de la población estudiada, se ha reportado que el 38% de pacientes AT desarrollan alguna neoplasia en su vida. Los portadores heterócigos del gen ATM constituyen del 0.35 al 1% de la población mundial, presentan elevada radiosensibilidad e incremento en el riesgo de padecer cáncer, se ha observado que el 8% al 18% de los pacientes con cáncer de mama son heterócigos para el gen ATM.

En el presente trabajo de investigación se evaluó la sensibilidad de seis líneas celulares linfoblastoides para el gen ATM: una homóciga recesiva, cuatro heterócigas y una silvestre. Las líneas celulares linfoblastoides AT se irradiaron con partículas ß una fuente radiactiva ⁹⁰Sr-⁹⁰Y durante un periodo de 17 min 18 s para obtener una dosis de 0.12 Gy. En la evaluación de la citotoxicidad de la RI se utilizó la técnica de tinción dual con una solución de diacetato de fluoresceína-

bromuro de etidio (FDA-BrEt). Para el análisis del efecto citostático se determinó la frecuencia de células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas, al calcular el índice de división nuclear (IDN) y el efecto genotóxico se analizó al contar micronúcleos (MN) en 1000 células binucleadas mediante el bloqueo de la citocinesis con Citocalasina-B (cyt-B). Tanto el IDN como los MN se determinaron como biomarcadores de daño al ADN.

Los resultados en la evaluación de los efectos de la RI, mostraron diferencias en la sensibilidad a los efectos genotóxicos ocasionados por la dosis bajas de RI en las líneas linfoblastoides con mutaciones en el gen ATM. Se observó mayor sensibilidad en la línea homóciga recesiva y en dos líneas heterócigas. Los datos obtenidos muestran que las líneas linfoblastoides heterócigas tienen diferente sensibilidad a los efectos genotóxicos producidos por dosis bajas de radiación. Dos de las líneas estudiadas se comportaron como las células silvestres y dos como homócigas recesivas, lo que indica que ATM sí está siendo funcional en las primeras, mas no en las segundas. Cabe señalar que los datos obtenidos implican que entre los individuos heterócigos pudiera haber quienes sean sensibles a dosis bajas de RI y tengan un mayor riesgo de desarrollar cáncer cuando sean expuestos a procedimientos de diagnóstico radiológico que utilizan dosis bajas.

ABSTRACT

lonizing radiation (IR) is classified as a mutagenic and carcinogenic agent due to its effects on DNA. It produces point mutations and chromosome breaks in any phase of the mitotic or meiotic cycle, and contributes toward the malignant transformation of normal cells. The health effects of high IR doses have been clearly identified but the effects of low doses are difficult to demonstrate and therefore currently under debate.

Ataxia Telangiectasia (AT) is one of the "Inestability Chromosome Syndromes" characterized by high radiosensitivity and increased cancer incidence. Cell lines obtained from AT patients and carriers represent an interesting cell model to study the effects of low IR doses. AT is an autosomal recessive disease caused by mutations in gene ATM. The ATM protein is able to detect the production of DNA double strand breaks and regulates the cellular signaling which initiates DNA repair. Although the incidence of patients with AT is relatively small, the heterozygote carriers constitute 0.35 to 1% of the world-wide population.

The aim of our study was to evaluate the sensitivity of six lymphoblastoid lines: one homozygous for ATM, four heterozygous and one possessing wild genes. AT cell lines were treated with 0.12 Gy. This low IR dose was achieved by irradiating cells with ß-particles from ⁹⁰Sr-⁹⁰Y radioactive source during 17 min 18 s. Citotoxicity was determined using the FDA method. The Micronucleus Cytochalasin-B Assay was carried out to measure citostaticity and genotoxicity. The frequency of mononucleated, binucleated and polynucleated cells was determined in 1000 cells, and the nuclear division index (IDN) calculated to establish the citostatic activity. Micronuclei (MN) were counted in 1000 binucleated cells to evaluate the potential genotoxicity.

Differences in the amount of MN induced by the low dose of radiation were found in the ATM lymphoblastoid cell lines. The greatest sensitivity was observed in the recessive homozygous cell line and two of the heterozygous cell lines, while the other two heterozygous cell lines behaved like the wild-type cells. These results indicate the lack of ATM functionality in the first group, but at least its partial

functionality in the second group of heterozygous cells. Data suggest that some heterozygous individuals might be more sensitive to low doses of IR, thus having a greater susceptibility to develop cancer when exposed to diagnostic radiological procedures, which due to their use of low IR doses, do not represent a risk for individuals having functional DNA repair capacities.

INDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	ii
I. ABREVIATURAS	Vii
II. INTRODUCCIÓN	1
II.1. Radiactividad	1
II.1.1. Partículas Alfa (α)	2
II.1.2. Partículas Beta (β)	2
II.1.3. Rayos Gamma (γ)	2
II.2. Radiación Natural	3
II.3. Radiación Artificial	4
II.4. Radiación lonizante	4
II.5. Interacción de la Radiación Ionizante con la Materia	4
II.5.1. Radiación Directamente Ionizante	5
II.5.2. Radiación Indirectamente Ionizante	5
If.6. Unidades Utilizadas en Radiación	6
II.7. Efecto de la Radiación lonizante en la Salud	7
II.8. Etapas de la Acción Biológica de la Radiación Ionizante	9
II.8.1. Etapa Física	9
II.8.2. Etapa Química	10
II.8.3. Etapa Biológica	10
II.9. Radiosensibilidad	11
II.10. Lesiones del ADN por la Radiación Ionizante	12
II.11. Cáncer y la Radiación Ionizante	12
II.12. Dosis Bajas de la Radiación Ionizante	13
II.13. Síndromes de Inestabilidad Cromosómica	16
II.14. Ataxia Telangiectasia	19
II.14.1. Características de las Células de AT	21
II.14.2. El Gen ATM	21
II.14.3. La Proteína ATM	21
II.14.4. La Proteína ATM regula los puntos de control del	
Ciclo Celular	23
II.14.5. Funciones de la Proteína ATM	24

II.14.6. Mecanismo de Acción de la Proteína ATM	25
II.14.7. Mecanismo de Activación de la Proteína ATM	29
II.14.8. Mutaciones en ATM	31
II.14.9. ATM y Cáncer de Mama	32
II.14.10. Sensibilidad de los Heterócigos del Gen ATM para	
Desarrollar Cáncer	33
II.14.11. Evaluación de la Frecuencia de los Micronúcleos en	
Estudios de Genotóxicidad	35
III. ANTECEDENTES	38
IV. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	42
V. HIPOTESIS	44
VI. OBJETIVOS	44
VI.1. General	44
VI.2. Específicos	44
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	45
VII.1. Líneas Celulares	45
VII.2. Cuantificación del Número Celular	45
VII.3. Cultivo de las líneas Celulares	46
VII.4. Condiciones de Irradiación	47
VII.5. Evaluación del Efecto Citotóxico de la Radiación Ionizante	49
VII.6. Evaluación del Efecto Citostático y Genotóxico de la	
Radiación Ionizante	50
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
XI. RESULTADOS	53
X. DISCUSIÓN	58
XI. CONCLUSIONES	63
XII. REFERENCIAS	64
XIII. ANEXOS	80

INDICE DE FIGURAS

. 3
16
22
29
30
36
55
56
57
45 54
80
80 81

I. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNPK: Proteína cinasa dependiente del ADN.

AF: Anemia de Fanconi.

ARN: Ácido ribonucleico.

AT: Ataxia Telangiectasia.

ATM: Ataxia telangiectasia mutado.

ATR: Ataxia telangiectasia relacionado con Rad3.

BRCA1: Primer gen relacionado a cáncer de mama.

BRCA2: Segundo gen relacionado a cáncer de mama.

BrEt: Bromuro de etidio.

Bq: Becquerel

CBN: Células binucleadas.

Ci: Curie

Chk: Cinasa dependiente de ciclinas.

CMN: Células momonucleadas.

CPN: Células polinucleadas.

Cyt-B: Citocalasina-B.

DL 50/60: Dosis letal media.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

erg: Ergio

FA-B: Anemia de fanconi-B.

FA-D1: Anemia de fanconi-D1.

FANCB: Gen Fanconi-B.

FANCD2: Gen de Fanconi-D2.

FAND1: Gen de Fanconi-D1.

FDA: Diacetato de fluoresceina.

GADD45: Proteína reparadora de daño.

Gy: Gray

ICRP: Comisión Internacional de Protección Radiológica (acrónimo de International Commission on Radiological Protection).

IDN: Índice de División Nuclear.

lg: inmunoglobulina.

inv: Inversion.

J: Joule

LET: Transferencia Lineal de Energía

mARN: Ácido ribonucleico mensajero.

MN: Micronúcleos.

MRE11: Complejo formado por RAD50/NBS1/MRE11

MRN: Complejo formado por MRE11, RAD50 y NBS1.

mSv: mili Sievert,

N: Número total de células.

NF-Kb: Factor nuclear kappa beta

NTC: Número Total de Células.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos (acrónimo de Solution Buffer Phosphate).

PI3K: Cinasa 3- Fosfato Inositol.

P53: Proteina 53

Rad: dosis absorbida de radiación (acrónimo de radiation absorbed dose).

RBE: Eficacia biológica relativa (acrónimo de relative biológical effectiveness).

rem: Roentgen equivalente para el hombre (acrónimo de roentgen equivalent man).

RI: Radiación ionizante

RPA: Proteína A de replicación.

Rpm: Revoluciones por minuto

SB: Síndrome de Bloom.

SI: Sistema Internacional de Pesos y Medidas

SIC: Síndromes de Inestabilidad Cromosómica.

SN: Síndrome de Nijmegen.

Sv: Sievert

t: Traslocación.

UNSCEAR: Comité Científico de la Naciones Unidas para el Estudio de los Efectos de las Radiaciones Atómicas (acrónimo de United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation).

UV: Ultra violeta.

VEB: Virus Epstein Barr.

XP: Xeroderma Pigmentosum.

II. INTRODUCCION

II. 1. Radiactividad.

La radiactividad es la transformación espontánea de los núcleos, con emisión de radiación ionizante (RI) a través de diversos procesos (Khan, 2003). En 1896 Henri Becquerel, mientras estudiaba cristales fluorescentes, descubrió que las sales de uranio emiten radiaciones capaces de atravesar materiales opacos a la luz ordinaria y dejar una impresión en las placas fotográficas. Inicialmente pensó que el fenómeno se debía a la exposición previa a la luz solar, pero pronto se percató de que los cristales no expuestos también emitían, en forma espontánea, esa radiación y que era capaz de ionizar el aire. Posteriormente los esposos Pierre y Marie Curie, estudiaron el fenómeno y descubrieron otros elementos con propiedades similares a las del uranio, a los que denominaron polonio y radio (Iturbe y col. 2005).

En 1902 Ernest Rutherford y Frederick Soddy, propusieron un modelo que describe el fenómeno de la radiactividad. Identificaron tres tipos de radiación nombrados por ellos como alfa (a), beta (ß) y gamma (γ). Rutherford observó que en presencia de un campo magnético la radiación a se desviaba en dirección contraria a los electrones y en menor grado, con lo cual concluyó que estaba cargada positivamente y que debería de estar formada por partículas pesadas, posteriormente verificó que son idénticas a los núcleos de helio. También observó que la radiación β es idéntica a los electrones, ya que en presencia de un campo magnético se desvía en la misma dirección y proporción que éstos. Varios años después se descubrió que la radiación γ es radiación electromagnética igual que los rayos X, pero de diferente energía (Hall, 1994).

En 1910 se tenían identificados a 40 elementos con esta propiedad y los llamaron radioelementos o elementos radiactivos, todos los elementos tenían un número atómico mayor que 83, también se percataron de que al emitir las radiaciones se transformaban en otro elemento, confirmándose que de un mismo elemento existían isótopos estables y radiactivos (Greening, 1981).

La radiactividad es un fenómeno que se origina en el núcleo de los átomos radiactivos, los núcleos que tienen un exceso de protones transforman uno de ellos en un neutrón emitiendo una partícula ß positiva, los que tienen exceso de neutrones emiten una ß negativa transformando un neutrón en protón, los núcleos pesados se deshacen silmutáneamente de dos protones y dos neutrones emitiendo una partícula a, algunos pasan de un estado excitado a otro más cercano al estado base, emitiendo fotones γ. Así mediante una o varias transformaciones sucesivas, los núclidos radiactivos se van acercando a la condición más estable. A este proceso se le denomina transformación radiactiva (Khan, 2003; Hall, 1994; Chang, 1998).

II.1.1. Partículas Alfa (a).

Son núcleos de ⁴He (dos protones y dos neutrones) emitidos espontáneamente por núcleos radiactivos. Son poco penetrantes auque muy ionizantes, transfieren bastante energía en cada choque y son detenidas por unos cuantos centímetros de aire o incluso por una hoja de papel. Toda la energía que transportan queda depositada en un volumen pequeño del material irradiado y son desviadas por campos eléctricos y magnéticos (Khan, 2003; Hall, 1994).

II.1.2. Partículas Beta (ß).

Son electrones que transfieren poca energía en cada choque y por esto necesitan varios choques para detenerse, son más penetrantes que la radiación a porque su poder ionizante es menor. Se requiere al menos un metro de aire o algunos milímetros de aluminio para que se detengan, y la energía que depositan en el material queda menos concentrada que al irradiar con las partículas a (Khan, 2003; Hall, 1994).

II.1.3. Rayos Gamma (γ).

Son ondas electromagnéticas, es el tipo de radiación más penetrante debido a que atraviesa materiales más gruesos que las partículas a y ß, se necesitan

varios centímetros de plomo o de concreto para atenuarlas. Como no poseen carga, los campos eléctricos y magnéticos no los afectan (Khan, 2003; Hall, 1994).

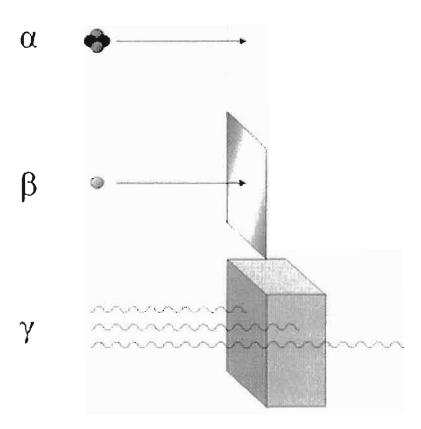


Figura 1. Poder de penetración de partículas alfa (a), beta (ß) y gamma (γ) (http://es.wikipedia.org).

II.2. Radiación Natural.

Se estima que el 70% de la radiación a la que la población del planeta tierra está expuesta proviene de fuentes naturales y procede del aire, los alimentos, la corteza terrestre y del espacio (Iturbe y col., 2005).

La cantidad de radiación natural recibida por un ser humano es relativamente similar en todas partes del planeta. Se pueden distinguir dos mecanismos principales de irradiación. Externa, cuando la radiación proviene de fuera del cuerpo, e interna, cuando el elemento radiactivo emisor ha sido ingerido o inhalado, y por lo tanto se encuentra ubicado dentro del cuerpo del individuo (Brandan y col., 1991).

II.3. Radiación Artificial.

En el siglo XX la humanidad logró sintetizar elementos radiactivos artificiales en reactores nucleares o aceleradores, la irradiación que recibe el ser humano de ellos constituye aproximadamente el 20 % de la irradiación total promedio en el mundo actual (Brandan y col., 1991). La gama de elementos radiactivos creados artificialmente en reactores nucleares y aceleradores es muy grande y ha permitido estudiar prácticamente todos los isótopos asociados a los elementos naturales. Los elementos radiactivos artificiales, al igual que los naturales, también finalizan decayendo en un núcleo estable al cabo de cierto tiempo (Hall, 1994).

II.4. Radiación Ionizante.

La RI es el flujo de las partículas cargadas (partículas a, partículas ß o iones acelerados) o de partículas no cargadas (neutrones, rayos X y fotones γ) que ionizan la materia y que proceden de los átomos radiactivos, es decir ionizan a otros átomos, desplazando los electrones de sus órbitas (Hall, 1994). Sí se imparte la suficiente energía sobre la materia se produce una ionización, en la cual un electrón queda liberado del átomo, formándose dos iones, uno positivo que es el átomo al que se le ha arrancado el electrón y uno negativo que es el electrón liberado (Greening, 1981).

II.5. Interacción de la Radiación Ionizante con la Materia.

La radiación que proviene de algún proceso de transformación radiactiva o de aceleración incide sobre la materia, la energía que transporta se deposita en el

medio a través de varios procesos, cuyo resultado es la ionización y excitación de los átomos que constituyen el medio (Hall, 1994; Rodríguez, 2003). La interacción de la RI con la materia depende del tipo de radiación, de su energía y del medio en el que incide (Khan, 2003).

Cuando las radiaciones interaccionan con la materia viva se producen fenómenos fisicoquímicos, como la ionización y la excitación. El efecto de la ionización es mucho más significativo que el de excitación, en ambos procesos ocurre una transferencia de energía. La energía promedio depositada por unidad de longitud de trayectoria se denomina Transferencia Lineal de Energía (LET), de manera que una radiación que produce pocos eventos de ionización por unidad de longitud de trayectoria (ligera ionización) se le denomina de baja LET como los rayos γ, X y partículas ß; mientras que las partículas con mayor carga y baja energía, que producen una gran densidad de ionizaciones en su camino, se denominan de alta LET, como las partículas a y los protones, por lo tanto producen mayor efecto o daño biológico (Iturbe y col., 2005).

II.5.1. Radiación Directamente Ionizante.

Es el tipo de radiación en el que la fuerza electromagnética de las partículas cargadas incidentes interacciona con los electrones y núcleos del medio. La acción mutua de sus campos eléctricos permite una transferencia de energía de manera directa, gradual y continua (Rodríguez, 2003). Es decir, interacciona de manera directa con la molécula blanco (Khan, 2003). Cuando son de baja energía se caracterizan por ser de alta LET (Greening, 1981).

II.5.2. Radiación Indirectamente Ionizante.

Es el tipo de radiación constituida por partículas no cargadas, no existe la fuerza electromagnética que permita la interacción a distancia, por lo cual interacciona mediante un proceso de choque en el que se alteran drásticamente las condiciones iniciales (Rodríguez, 2003). Es decir al atravesar la materia producen partículas cargadas o su energía se transfiere a uno o varios electrones, las

cuales son las que ionizan a otros átomos (Khan, 2003), se caracterizan por ser de baja LET (Greening, 1981).

II.6. Unidades Utilizadas en Radiación (NCRP, 1987; ICRU, 1998).

Actividad de una muestra es el número de núcleos que sufren un decaimiento radiactivo en cada unidad de tiempo. La unidad fundamental de la actividad es el Curie (Ci), un Ci corresponde exactamente a 3.7 x 10¹⁰ desintegraciones nucleares por segundo. La unidad de la actividad aceptada por el Sistema Internacional de Pesos y Medidas (SI), que equivale a una desintegración por segundo, es el Becquerel (Bq):

```
1 Bq = 1 s<sup>-1</sup>

1 Ci = 3.7 \times 10^{10} Bq

1 Bq = 2.7 \times 10^{-11} Ci
```

Para caracterizar el efecto de la radiación sobre la materia viva o inanimada, se definen magnitudes como:

- La dosis absorbida, que es la cantidad de energía que la radiación deposita en una unidad de masa del material irradiado (Hall, 1994). La unidad aceptada por el SI es el Gray (Gy), que es el depósito por radiación ionizante de 1 J en un kilogramo de materia irradiada.

```
1 Gy = 1 J/kg
1 Gy = 100 rad.
1 rad = 100 erg/g.
```

- La dosis equivalente se utiliza para determinar el daño biológico específico que producen las diversas radiaciones en el organismo, corrige la dosis absorbida respecto al tipo de radiación (Morgan y Turner, 1967). La unidad que se empleaba era el rem (acrónimo de roentgen equivalent man), la unidad designada por el SI, es el Sv.

1 rem =
$$10^{-2}$$
 Sv
1 Sv = 1 Gy = 1 J/kg = 100 rems

- La dosis efectiva, determina el efecto biológico de la radiación que depende de la región del cuerpo que se haya irradiado y del tipo de radiación. Por esta razón, el rad a menudo se multiplica por un factor llamado RBE (acrónimo de relative biological effectiveness), el producto se llama rem (Chang, 1998).

 $1 \text{ rem} = 1 \text{ rad } \times \text{RBE}$

La RBE se determina por el factor de calidad dependiendo del tipo de radiación, así se tiene:

Para los rayos X, electrones y rayos y su RBE es 1, son equivalentes:

1 rad = 1 rem

Para los neutrones térmicos es 5.

Para neutrones y partículas cargadas pesadas es 20 (NCRP, 1987; ICRP, 1991).

II.7. Efecto de la Radiación Ionizante en la Salud.

Han transcurrido más de cien años de manejo y aprovechamiento de la RI, durante los cuales se ha mantenido el interés por estudiar los efectos en la salud, las aplicaciones médicas y bélicas han estimulado fuertemente estos estudios (Iturbe y col., 2005). Las primeras manifestaciones de los efectos de las RI sobre los tejidos humanos, se observaron poco tiempo después del descubrimiento de los rayos X (1895) y de la radiactividad natural (1896). La evidencia clínica de los daños en la piel indicó que las radiaciones pueden ser peligrosas, por lo que se inició el estudio de sus efectos en los seres vivos. Posteriormente se descubrió que la exposición a la RI de las células germinales afectaba a los descendientes (Hall, 1994).

Las alteraciones producidas en el organismo por debajo de 1Gy son reversibles, conforme aumenta la dosis se incrementa la severidad de éstas y la recuperación

del individuo se dificulta (Brandan y col., 1991). La dosis a la cual se produce un 50% de decesos se denomina Dosis letal media (DL 50/60), que significa que se espera el fallecimiento del 50% de los individuos expuestos en 60 días (Iturbe y col., 2005). El valor de la DL para un ser humano adulto sano y una irradiación aguda se estima entre 3 y 5 Gy, si la dosis se incrementa a más de 7 Gy disminuyen las esperanzas de sobrevivir. Con dosis de 10 Gy se produce la perforación del intestino que da lugar a una peritonitis y a septicemia. Con 50 Gy se produce shock nervioso, edema y hemorragia en el sistema nervioso central, así como la muerte en pocas horas. Estos efectos además de depender de la cantidad y de la duración de la RI recibida también dependen de factores personales como: sexo, edad, estado de salud y nutrición (Brandan y col., 1991).

Los efectos de la RI en los seres vivos se pueden clasificar (Hall, 1994; Khan, 2003, Rodríguez, 2003; Suntharalingam y col., 2004):

- Por el tiempo de aparición, pueden ser lesiones precoces, cuando el efecto aparece en minutos u horas después de la exposición. Ej. Eritema cutáneo, naúseas. Lesiones tardías, cuando aparece en meses y años después de la exposición, como el cáncer, la radiodermatitis crónica y las mutaciones génicas.
- El efecto biológico ocurre en las células somáticas o en las reproductivas. Las lesiones somáticas que se manifiestan en el individuo son eritemas, quemaduras de piel y cáncer, entre otros. El daño en las células germinales no se manifiesta en el individuo expuesto, sino en su descendencia, produciéndose mutaciones genéticas.
- Por la dosis, los efectos pueden se deterministas, cuando son producidos por dosis altas, la aparición de los efectos se originan si la dosis absorbida rebasa un valor umbral, esto es un valor de la dosis por debajo del cual no se produce el efecto. Son resultado de diversos procesos, en particular de la muerte celular y deficiencias en la división celular. Estos efectos pueden ser desde enrojecimiento de la piel, malestar general y vómito, hasta la esterilidad, las cataratas y daños irreversibles en los tejidos hematopoyéticos y el tracto gastrointestinal, cuya

consecuencia puede ser fatal. En general la severidad del daño depende de la dosis absorbida.

Por otra parte los efectos estocásticos son de naturaleza aleatoria, producidos por dosis bajas, no tienen un valor de dosis umbral y se manifiestan mucho tiempo después de la exposición; su probabilidad de aparición se incrementa al aumentar la dosis absorbida, la severidad del daño no depende de la dosis absorbida. Son consecuencias de alteraciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células y entre estos efectos se encuentra los diferentes tipos de cáncer.

II.8. Etapas de la Acción Biológica de la Radiación Ionizante.

El efecto biológico de la RI resulta principalmente del daño al ADN, el cual es un blanco crítico (Hall, 1994). La RI actúa a través de tres etapas denominadas:

II.8.1 Etapa Física:

Se produce por la interacción de los electrones orbítales con las partículas o los fotones que constituyen el haz de la RI, los electrones secundarios formados en la interacción, ionizan y excitan a otros átomos provocando una cascada de ionización (Hall, 1994). La RI al incidir sobre la materia viva puede producir dos tipos de efectos, los efectos directos son consecuencias de las ionizaciones que se producen en los átomos que forman las moléculas del ADN, ácido ribonucleico (ARN), proteínas, enzimas, etc (Iturbe y col., 2005). Este tipo de efecto provoca la ruptura de las moléculas del ADN o los cambios en la información genética que afecten el funcionamiento normal celular. Es un fenómeno dominante en las radiaciones con alta LET como las particulas a y los neutrones que inciden directamente sobre los átomos de las moléculas. Los efectos indirectos se producen cuando interaccionan el haz de la radiación con otros átomos y moléculas de la célula como el agua, pudiéndose ionizar estas moléculas o romperlas originando radicales libres (átomos o moléculas con un electrón no apareado) ambos tipos de productos son capaces de reaccionar entre sí o con otras moléculas, que al difundir hasta la molécula de ADN, la dañan de manera indirecta (Hall, 1994; Khan, 2003).

II.8.2. Etapa Química (Khan, 2003; Chang, 1998):

La radiación de partículas a, ß o de rayos y puede quitar electrones a los átomos y moléculas que se encuentren en su trayectoria, formando así iones y radicales. Los radicales fibres son fragmentos moleculares que tienen uno o más electrones desapareados, casi siempre tienen una vida corta y son muy reactivos. Por ejemplo cuando el agua se irradia con partículas ß se produce la siguiente reacción:

$$H_20$$
 Radiación $H_20^+ + e^-$
 $H_20^+ + H_20$ \longrightarrow $H_30^+ + OH$ (radical hidroxilo)

El electrón en (su forma hidratada) puede reaccionar después con el agua o con un ión hidrógeno para formar hidrógeno atómico, y con el oxígeno para formar el ión superóxido, O_2^- (un radical):

$$e^- + 0_2 \longrightarrow 0_2^-$$

Los iones superóxido y otros radicales libres atacan las membranas celulares de los tejidos y una gran variedad de compuestos orgánicos, como enzimas y moléculas de ADN. Los compuestos orgánicos mismos pueden ionizarse de manera directa y destruirse por la radiación de alta energía.

II.8.3. Etapa Biológica:

Se inicia con la activación de las reacciones enzimáticas para reparar los diversos daños producidos en la célula por la RI, dependiendo de la zona que afecte, si la molécula ionizada es parte de la membrana celular es posible que cause la muerte de la célula (que será remplazada por otra), si es parte de un organelo citoplasmático ésta puede llegar a destruirse y sus funciones serían asumidas por alguna estructura similar, y si el daño fuese en el ADN del núcleo celular, parte de la información almacenada de los genes puede modificarse o perderse y dar lugar a mutaciones (Iturbe y col., 2005). El daño a nivel del ADN se manifestará en la siguiente mitosis, cuando la célula intente reproducirse, es posible que no se lleve

a cabo la mitosis y la célula muera sin dejar descendencia, pero también es posible que el gen dañado esté relacionado con la reproducción de esta célula y esta célula como sus descendientes presenten una división descontrolada dando lugar a un tumor. Debido a la complejidad del proceso de replicación celular y a la necesidad de precisión al transmitir el código genético, una célula es más sensible a los efectos de la RI durante la mitosis que en otras etapas del ciclo celular (Brandan y col., 1991).

Las interacciones de la RI, pueden traducirse en alteraciones en la bioquímica celular, en las cadenas de carbohidratos, en los cambios estructurales en las proteínas y en las modificaciones de la actividad enzimática; lo que repercute en las alteraciones de la membrana celular, en las mitocondrias, en el núcleo celular (ADN) y en los organelos celulares (Iturbe y col., 2005).

II.9. Radiosensibilidad.

Está definida en términos de la rapidez con que se manifiestan los daños, es la magnitud de respuesta de las estructuras biológicas, provocada por la Rl. Se define como más sensible un elemento biológico cuanto mayor es su respuesta a una dosis determinada de la Rl, y como radioresistente cuando necesita mayor dosis de la Rl para que se obtenga un efecto determinado (Suntharalingam y col., 2004).

La mitosis es la etapa del ciclo celular más sensible al daño inducido por la RI, las células menos sensibles son las más diferenciadas, con funciones específicas y que se dividen poco o ya no se dividen, como las del músculo estriado y las neuronas, así como las células de vida corta que representan la última etapa de un proceso de diferenciación, como los granulocitos y los eritrocitos. Las células más sensibles a los efectos de la RI son las células germinales, las demás células con etapas de estabilidad y etapas de reproducción alternadas, tienen una radiosensibilidad intermedia (Brandan y col., 1991).

En la clínica uno de los primeros reportes de radiosensibilidad a dosis bajas fue en 1967. En este, un niño que sufría de ataxia telangiectasia recibió radioterapia

11

para el cáncer oral que padecía, sufriendo de severas quemaduras. Posteriormente estos pacientes fueron calificados como sensibles a la RI (Cuncliffe y col., 1975).

II.10. Lesiones del ADN por la Radiación lonizante.

La sensibilidad a la RI a nivel celular se manifiesta en la incapacidad de detener el ciclo celular cuando la célula presenta un daño al nivel del ADN (Loeffler y col., 1990).

Las lesiones que se pueden producir son: la ruptura de una de las cadenas que forman el ADN (lesión subletal) cuando el daño ocurre en el enlace fosfodiéster (entre el fosfato y la desoxirribosa) o con mayor frecuencia entre la base nitrogenada y la pentosa, después de la ruptura del enlace fosfodiéster las dos hebras del ADN se separan con penetración de moléculas de agua en esa zona, rompiéndose los puentes de hidrógeno entre las bases. También se puede producir ruptura de la cadena doble (lesión letal), que es una lesión compleja y se produce como consecuencia de la ruptura de las dos hebras del ADN en sitios muy próximos después de la interacción única o por combinación de dos rupturas simples de cadenas complementarias, cuando una segunda partícula o fotón choca en la misma región del ADN antes de que la primera ruptura simple haya tenido tiempo de ser reparada (Hall, 1994; Khan, 2003).

II.11. Cáncer y la Radiación Ionizante.

Desde hace mucho tiempo se conoce que la exposición a dosis altas de RI puede inducir cáncer en seres humanos y animales. El cáncer es una enfermedad en la cual se altera la división normal de las células, por lo que se producen tumores, el crecimiento descontrolado del tumor altera el funcionamiento normal del órgano en que se encuentra (Alberts y col., 2002). Por otra parte, está bien establecido que las células (normales y cancerosas) se pueden destruir por radiación con tratamientos apropiados. Esta terapia consiste en exponer al enfermo a una radiación suficiente y especialmente controlada para acabar con las células

cancerosas sin dañar demasiadas células normales y tratando de evitar la inducción de otros cánceres (Chang y col., 1997).

Estudios epidemiológicos han establecido que ciertas características biológicas como el género, la edad y la historia familiar, junto a otras características ambientales, pueden actuar como factores de riesgo en algunos tipos de cánceres (Cardis y col., 2005). Un factor de riesgo puede ser la RI, que se utiliza ampliamente para la detección temprana y la terapia contra el cáncer (Brandan y col., 1991). Se ha observado que familias con antecedentes de cáncer presentan diversas mutaciones específicas en genes de susceptibilidad que elevan considerablemente el riesgo de desarrollar cáncer (Scott y col., 2002). La exposición a la RI induce al desarrollo de leucemias y de otros tipos de cánceres, los cuales presentan periodos de latencia muy largos, aproximadamente de 10 años para las leucemias y más de 30 años para los tumores sólidos (Frischknecht y col. 2000). Se ha observado que la médula ósea es muy radiosensible, y que otros órganos como las glándulas mamarias, el estómago, el pulmón, la tiroides y los huesos también presentan cierta radiosensibilidad (Pollycove y Maryland, 2001). Si bien la evidencia estadística de la inducción de cáncer por exposición a dosis altas de radiación es inobjetable, el posible riesgo a dosis bajas es aún objeto de estudio científico y de controversia.

II.12. Dosis Bajas de la Radiación Ionizante.

Los seres vivos estamos expuestos a niveles bajos de RI, cada año recibimos aproximadamente 0.002 Gy, procedentes del sol, las rocas, el suelo y de residuos radiactivos de pruebas de armas nucleares. No se ha demostrado que la exposición a dosis bajas de la RI del medio ambiente afecte la salud de los seres humanos. Sin embargo, los organismos dedicados a la protección radiológica utilizan la hipótesis conservadora de que incluso dosis muy bajas o moderadas, la RI aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer, y que esta probabilidad aumenta proporcionalmente con la dosis recibida (hipótesis lineal sin umbral). Esta hipótesis explica el modelo de la carcinogésis de la RI, indicando que un único impacto de la RI en la célula puede causar una alteración, originando una

mutación, que posiblemente sea la primera célula cancerosa de un tumor (Brenner y Elliston, 2004).

Las investigaciones han brindado las estimaciones relativas del riesgo a exposiciones de dosis altas y de dosis bajas de la radiación ionizante (Rothkamm y Lobrich., 2003). Existen organismos encargados de la protección radiológica, como la ICRP (acrónimo de International Commission on Radiological Protection), el cual establece medidas fundamentales para la protección contra riesgos derivados de la exposición a la RI y establecen lineamientos de seguridad para el mantenimiento y manejo de las fuentes de radiación ionizante. Los límites recomendados son: para personal ocupacionalmente expuesto una dosis efectiva de 100 mSv (0.1 Gy) en 5 años (una dosis promedio de 0.02 Gy por año), para el público una dosis efectiva de 1 mSv (0.001 Gy) por año. Estos límites no se aplican a las dosis recibidas por exposiciones con fines de diagnóstico o tratamiento médico, ni a las debidas a la radiación natural (ICRP, 1998; Rodríguez, 2003).

La estimación del riesgo para dosís bajas se basó en la extrapolación de los datos obtenidos a dosis elevadas, utilizando el modelo lineal sin umbral (Muller, 1954). Este modelo asume que la respuesta celular, incluyendo la reparación del ADN, operan eficientemente igual a dosis altas y a dosis bajas de la RI (UNSCEAR, 2000). Posteriormente la ICRP rechazó este modelo, debido a que no era el más adecuado para reflejar los efectos en la salud de dosis bajas.

Actualmente se han desarrollado varios modelos mediante los cuales se pretende explicar los efectos en la salud de las dosis bajas de la RI. Pierce y Preston (1996) plantearon dos propuestas: la primera menciona que no existen dosis completamente seguras y el uso de la RI se debe determinar en base al riesgo/beneficio y la segunda propuesta índica que los riesgos no se pueden medir y por lo tanto son inexistentes. Según el UNSCEAR (acrónimo de United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) una dosis baja de la RI, es aquella menor a 0.2 Gy, con la cual resulta muy improbable que ocurra

más de un evento de absorción de energía en las partes críticas de la célula y que la dañe durante el tiempo en el que pueden operar en ella sus mecanismos de reparación (UNSCEAR, 1985).

En el 2003 Brenner y col. realizaron diferentes extrapolaciones de los datos epidemiológicos a dosis altas para poder explicar el posible efecto mutagénico y carcinogénico de las dosis bajas de la RI, plantearon 5 posibles modelos. El primer modelo (curva a) muestra una relación lineal sin umbral dosis-efecto, es decir a mayor dosis mayor efecto. En un segundo modelo (curva b) se observa una curva supralineal y se ha considerado varias interpretaciones para este modelo, la primera interpretación indica la existencia de una población pequeña de individuos del total de la población que son denominados hipersensibles a la RI, la segunda interpretación se basa en términos de radioresistencia denominada también respuesta adaptativa, la cual indica que después de una primera dosis de radiación (generalmente 0.005 - 0.1 Gy) disminuye la radiosensibilidad a una subsecuente exposición, comprometiéndose probablemente algún mecanismo de reparación del ADN, y una tercera interpretación que explica el efecto bystander, el cual considera que las células dañadas pueden transmitir factores que dañan a las células adyacentes que no fueron directamente afectadas por la RI. En un tercer modelo (curva c) no presenta umbral por lo tanto no se puede medir la dosis mínima que produce un efecto. El cuarto modelo (curva d) explica que para poder observar un efecto se debe superar el umbral. En el quinto modelo (curva e) se observa una respuesta hormética, la cual ocurre si una dosis de radiación reduce la incidencia de algún efecto deletéreo. Estas propuestas se pueden observar en la figura 2.

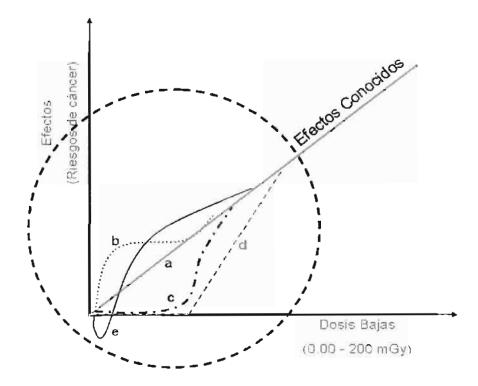


Figura 2. Representación esquemática de los cinco posibles modelos de desarrollar cáncer por dosis bajas de la RI (Brenner y col., 2003).

II.13. Síndromes de Inestabilidad Cromosómica.

Los Síndromes de Inestabilidad Cromosómica (SIC) son un grupo de enfermedades generalmente con herencia autosómica recesiva, que presentan un fenotipo clínico característico, una alta frecuencia de alteraciones cromosómicas y una mayor predisposición al cáncer (Salamanca, 1990).

Una de las características moleculares comunes de los SIC es que presentan deficiencias para mantener la integridad genómica, que produce una acumulación de daño en el ADN, lo cual promueve la transformación celular y la neoplasia (Taylor, 2001). También presentan anormalidades estructurales en los cromosomas que son ocasionadas por la acción de los agentes mutagénicos como la RI que produce rompimientos, los cuales se manifestarán en una sola cromátide si el daño ocurrió después del periodo de replicación del ADN, o en

7

ambas cromatides si la lesión fue sufrida en el periodo presintético (Salamanca, 1990).

En 1968 Cleaver público un trabajo en el que se da a conocer que los fibroblastos en cultivo procedentes de un paciente afectado de Xeroderma Pigmentosum (XP) no eran capaces de llevar a cabo la reparación por escisión de nucleótidos después de la exposición a la radiación ultravioleta (UV). Este tipo de trabajo sirvió para estimular el interés de investigar la respuesta a los agentes genotóxicos de las células de personas afectadas con distintas enfermedades hereditarias, en especial con aquellas enfermedades que están asociadas con anomalías cromosómicas o con una elevada incidencia de neoplasías.

Los SIC tienen una entidad clínica variable y un incremento en la frecuencia de neoplasias. Entre ellos se encuentran aquellos en los que la alteración se ha encontrado en un solo gen como la Ataxia Telangiectasia (AT), el Síndrome de Bloom (SB) y el Síndrome de Nijmegen (SN) así como aquellos en los que se ha encontrado que la alteración se presenta en un gen que pertenece a una vía compuesta por varios genes y presentan heterogeneidad genética como la Anemia de Fanconi (AF) con 8 genes identificados y el XP con 7 genes identificados (Salamanca, 1990; Taylor, 2001; Digweed, 2003).

Probablemente los genes de inestabilidad cromosómica están involucrados principalmente en la reparación del daño al ADN. Es también importante el papel que desempeñan en la regulación de la proliferación y en los puntos de control del ciclo celular (Taylor, 2001).

Los pacientes con AF, presentan pancitopenia progresiva debido a la disminución de medula ósea, retraso mental, talla baja, anomalías esqueléticas, hiperpigmentación, anomalías renales, genitales y oculares. Las células de los individuos con AF presentan una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas, con la presencia de cromosomas dicéntricos, fragmentos y figuras tri-tetrarradiadas asimétricas porque involucran cromosomas no homólogos. La frecuencia de estas alteraciones se incrementa en forma notable cuando las células se exponen a la acción de distintos agentes

mutagénicos y carcinogénicos, en especial de aquellos que producen enlaces cruzados en el ADN, tales como la mostaza nitrogenada, la mitomicina-C o metilmetano-sulfonato. Las células de AF también son muy sensibles a la acción letal de estos agentes, pero no al daño en el ADN producido por la radiación UV o la ionizante (Salamanca, 1990; Paz y col., 2002).

Los pacientes con SB se caracterizan por un peso notablemente bajo al nacer y un crecimiento raquítico, sensibilidad de la piel a la luz solar, mancha facial en mariposa, tienen la cabeza alargada y son muy susceptibles a las infecciones. Las células de SB presentan un número muy elevado de rupturas y reordenaciones cromosómicas tetrarradíales simétricas entre cromosomas homólogos y presentan un aumento de intercambios de cromátidas hermanas de 10 a 15 veces mayor que la frecuencia en las células normales (Salamanca, 1990; Taylor, 2001).

El síndrome de XP desde el punto de vista clínico, se caracteriza principalmente por una extrema fotosensibilidad de las regiones expuestas de la piel, los ojos y la lengua. Esta enfermedad se produce como consecuencia de las diferentes alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN dañados por la luz UV. En la exposición de estos pacientes a la luz solar, su piel presentará eritema, seguido por atrofia, telangiectasias y desencadenaran en cáncer de piel. Además presentan microcefalia, deficiencia mental progresiva, anomalías en el desarrollo sexual, sordera, coreoatenosis, ataxía y arreflexia. Existen 9 subtipos clínicos de la enfermedad que incluyen formas cutáneas y neurológicas (Salamanca, 1990; Taylor, 2001; Paz y col., 2002).

Los pacientes con SN se caracterizan por presentar microcefalia, cara de pájaro, talla corta, inmunodeficiencia combinada acompañada de infecciones recurrentes. Los linfocitos de estos pacientes presentan frecuentemente aberraciones cromosómicas como inversiones y traslocaciones. Son particularmente sensibles a la RI y a químicos como la bleomicina que producen daño a nivel de la doble hebra del ADN. Aproximadamente el 40% de los pacientes desarrollan un linfoma antes de los 20 años de edad (Shiloh, 1997; Taylor, 2001).

El síndrome de AT también se puede mencionar dentro de las enfermedades hereditarias caracterizadas por presentar respuesta celular defectuosa en el daño al ADN y una elevada incidencia de desarrollar cáncer. A continuación este síndrome será tratado más ampliamente.

Los SIC presentan una baja incidencia en todas las poblaciones, los heterócigos de estos síndromes pueden encontrarse en cifras tan altas como el 10% de la población general y normal (Digweed, 2003). Es importante indicar que estos síndromes no son muy frecuentes en la población en general, como modelo de estudio representa una opción para evaluar la susceptibilidad individual. Por lo que en este estudio utilizaremos líneas celulares linfoblastoides de AT.

II.14. Ataxia Telangiectasia.

La Ataxia Telangiectasia o síndrome de Louis-Bar es un síndrome progresivo y degenerativo que afecta a una variedad de sistemas en el cuerpo, suele iniciarse durante la niñez. Los pacientes con AT parecen normales en el nacimiento, generalmente las primeras señales de la patología aparecen durante el segundo año de edad. La Dra. Elena Boder en 1957 acuñó el nombre de AT, por las dos características clínicas más resaltantes de esta enfermedad. La palabra ataxia describe la marcha inestable de los pacientes, debido a la pérdida del control de los movimientos voluntarios, como el caminar y el hablar, lo cual se debe por la pérdida gradual de las células de Purkinje en el cerebelo, que es la parte del cerebro involucrada de la coordinación motora y usualmente es el primer signo clínico. La palabra telangiectasia describe a la red de vasos sanguíneos de pequeño calibre que se encuentra en las conjuntivas, en la superficie de las orejas y en las mejillas expuestas a la luz solar (Boder, 1985; Savitsky y col., 1995; McKinnon, 2004).

Los niños con AT en un 70% aproximadamente presentan inmunodeficiencias, con la disminución de los niveles de IgA, IgE e IgG2, que normalmente desencadena infecciones respiratorias reincidentes. Tienden a desarrollar neoplasias en el sistema sanguíneo con una frecuencia 1000 veces mayor que la población en general, presentan incidencia incrementada de cáncer del tipo

linfomas no-Hodgkin y leucemias, la mayoría es de tipo linfático (Shiloh, 1995). Por la extrema sensibilidad a la RI que presentan estos pacientes no pueden tolerar la radiación terapéutica como tratamiento al cáncer y esta radiosensibilidad está relacionada con la defectuosa reparación del daño al ADN (Savitsky y col., 1995). Las características como la inestabilidad cromosómica y la radiosensibilidad parecen estar relacionadas con la activación defectuosa de los puntos de control del ciclo celular (Lavin y Khanna, 1999). La esterilidad resulta de defectos tempranos en la meiosis que involucran eventos de recombinación genética (Barlow y col., 1997). Otros rasgos como telangiectasia ocular y resistencia a la insulina son más difíciles de relacionar con la defectuosa respuesta al daño del ADN (McKinnon, 2004).

Además de estas características principales, algunos pacientes con AT pueden padecer de diabetes mellitus, encanecido prematuro de cabello, dificultad para masticar que causa ahogo y retraso en el crecimiento. A pesar de ser un desorden multisistémico, los pacientes mantienen la inteligencia normal o incluso mayor a la normal (Savitsky y col., 1995).

En las células de los pacientes con AT se ha encontrado menor cantidad de aberraciones cromosómicas que en los de AF y el SB. Se ha observado que los cromosomas 7 y 14 son los más afectados con aberraciones de tipo de inversiones y de traslocaciones, encontrando inv(7), inv(14), t(7;14) o t(14;14). Los sitios de rompimiento más frecuentes son: 7p14, 7q35, 14q12 y 14qter, 2p11, 2p12, 22q12, 22q13. Todos estos sitios de rompimientos corresponden a la localización de los genes de las inmunoglobulinas, de los receptores de los antígenos de linfocitos T o de los antígenos leucocitarios. Esto sugiere el rearreglo de estos genes durante la maduración linfocítica, los cuales requieren del corte y replicación del ADN, lo cual probablemente explique la inmunodeficiencia característica de este síndrome (Lavin y Khanna, 1999; Gatti y col., 2001; Lavin y col., 2004).

La causa principal de muerte en los pacientes con AT es la neumonía y las enfermedades del pulmón crónicas, que resulta de aspiraciones por defectos del masticar o del tragar debido al daño neurológico progresivo (Lefton-Greif y col...

2000). Esta disfunción también está acompañada del aumento en la incidencia de neoplasias del sistema linforreticular como las leucemias y los linfomas (Gumy y col., 2004). Aproximadamente un 10% de los individuos con AT desarrollan neoplasias antes de los 20 años de edad. La incidencia global de cáncer es muy elevada (Morrell y col., 1986). El gen ATM mutado está estrechamente relacionado con el desarrollo de cáncer de mama (Angele y col., 2003).

Estudios epidemiológicos indican que la AT es un síndrome raro que se ha estimado que ocurre en un rango entre 1 en 40 000 a 1 en 300 000 por nacimiento en las poblaciones de los EEUU y de Europa respectivamente (Angele y Hall, 2000). El 0.35% al 1% de la población en general es heteróciga para el gen ATM con algunas variaciones en diferentes poblaciones étnicas (Bretsky y col., 2003; Swift y col., 1986).

II.14.1. Características de las Células de AT.

Las células provenientes de los pacientes con AT son hipersensibles a la Rł (Lavin, 1999) y a las drogas radiomiméticas como la bleomicina (Cohen y Simpson, 1983). Presentan inestabilidad cromosómica, anormalidades en la recombinación genética y alteraciones en los procesos de detención en el ciclo celular (Gatti y col., 1991; Lavin y Khanna, 1999).

II.14.2. El Gen ATM.

El gen mutado en AT es Ataxia telangiectasia mutado (ATM) y fue clonado en 1995. Este gen se localiza en el cromosoma 11q22-23 y está compuesto de 66 exones de los cuales 62 codifican para un mARN de 13 kb (Shiloh, 2003; Lavin, 1999).

II.14.3. La Proteína ATM.

La proteína ATM es miembro de la familia PI3K, se localiza principalmente en el núcleo, posee una masa molecular de 350.6 kDa de aproximadamente 3056

aminoácidos. Es una proteína grande que posee un grupo C-terminal similar al de otras proteínas de la familia PI3K, como ATR y ADNPK (Shiloh, 2003).

Estructuralmente la proteína ATM está formada por tres dominios principales: un dominio **FAT** común en otras proteínas relacionadas que es como FRAPP/ATM/TRRAP, un dominio PI3K en el cual se ubica el grupo N-terminal entre los residuos de los aminoácidos 2855-2875, esta región es requerida para la activación de p53 en respuesta al daño del ADN y un dominio FATC en el cual se ubica el grupo C-terminal de aproximadamente 350 aminoácidos (Turrence y col., 2001), como se observa en la figura 3.

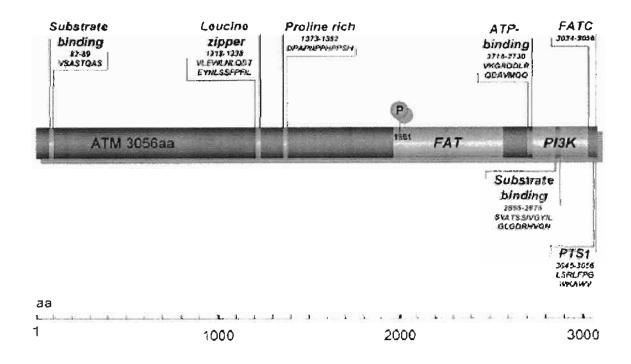


Figura 3. Proteína ATM indicando sus tres dominios principales y varios dominios supuestos (Lavin y col. 2004).

II.14.4. La Proteína ATM Regula los Puntos de Control del Ciclo Celular.

La radiosensibilidad en las células de AT parece no deberse a los defectos en la habilidad de reparar la ruptura de las hebras del ADN o por el daño excesivo en el ADN, si no más bien a defectos en la monitorización o selección para captar la señal de la ruptura o de daño en el ADN (Lavin y col., 2004).

Para que la célula pueda sobrevivír después de la ruptura de la doble hebra del ADN ocasionado por la RI, es importante la inhibición del ciclo celular a través de la activación de los puntos de control en el ciclo celular, los cuales detienen la proliferación celular (Angele y col., 2003).

Los factores involucrados en la respuesta del daño al ADN están intimamente relacionados con la activación de los puntos de control, porque varios sustratos ATM son muy importantes en el ciclo celular. Se ha observado en las células aisladas de los pacientes con AT, alteración en los puntos de control del ciclo celular, por ejemplo en la proteína p53 que es requerida para activar el punto de control G1/S y la proteína Chk2 para actuar en G2/M, ambas proteínas están inducidas por el daño al ADN (Khanan y col., 1995; Meyn, 1995).

En cultivos celulares de linfocitos, se ha observado que las células AT no expuestas a RI, presentaron una menor tasa en la síntesis del ADN y una fase S más larga en el ciclo celular. En cambio la mayoría de las células de AT irradiadas fueron significativamente más resistentes a la inhibición en la síntesis del ADN provocado por la RI (Ford y Lavin, 1981).

En varios estudios al exponer las células de AT a la RI, se ha reportado una acumulación de las células en la fase G_2 (Khanan y col., 1995), mientras que otros estudios sugieren un retraso tanto en G_1 como en la fase S (Lavin, 1999). Se ha demostrado, que en un tiempo corto después de la irradiación, las células de AT presentan un bloqueo reducido en G_2 , pero posteriormente (posiblemente después de que el daño en el ADN haya sido procesado incorrectamente) el bloqueo en G_2 se prolonga (Beamish y Lavin, 1994).

Cualquier alteración en los puntos de control en las células de AT después del daño al ADN por la RI, es ocasionado por una fosforilación defectuosa en las proteínas que son sustratos de ATM, debido a que ATM no podrá activarlos para que realicen sus funciones de reparación del ADN (Motoyama y Naka, 2004). Se ha observado que la proteína BRCA1 que incrementa el riesgo de desarrollar cáncer en los pacientes con AT, al no ser fosforilada adecuadamente por la proteína ATM, va a permitir el desarrollo del cáncer (Lavin y col., 2004). Estas proteínas están asociadas en la respuesta del daño al ADN (Ball y Xiao, 2005).

II.14.5. Funciones de la Proteína ATM.

La proteína ATM está localizada en el núcleo y en el citoplasma de las células, se ubica principalmente en el núcleo y en menor proporción se encuentra en el citoplasma en vesículas (Turrence y col., 2001). La ausencia de la proteína ATM nuclear bloquea la respuesta del daño al ADN y el ATM citoplasmático de cierta manera es responsable de la respuesta a intermediarios reactivos como el oxígeno, que son productos del metabolismo o del mecanismo de defensa a agentes extraños, por lo que se considera que las células de AT están en constante estrés oxidativo (Lavin y col., 2004; Barlow y col., 1997).

En condiciones normales la proteína ATM participa en la detección y la reparación del daño al ADN, como en el control del ciclo celular, enviando a las células que no pudieron reparar el daño del ADN a muerte celular programada (apoptosis). Posiblemente la proteína ATM en la apoptosis genere inactivación de la proteína cinasa que actúa en la capacidad de unión del ADN, previniendo la reparación y la señalización de daño al ADN (Angele y Hall, 2000).

La proteína ATM desempeña un papel importante en la respuesta celular, al captar la señal de la ruptura de la doble hebra del ADN (Shiloh, 2003). La falta de una respuesta normal del gen ATM puede romper el rearreglo de los genes que codifican a inmunoglobulinas y causar la inestabilidad genómica, que finalmente generará un cáncer (Lavin y col., 2004). La proteína ATM también es requerida para el procesamiento de las rupturas de las hebras del ADN que ocurren en procesos endógenos como la meiosis o la replicación, en la exposición a agentes

externos como la RI, en la maduración del sistema inmune y en el mantenimiento de telómeros (Angele y col., 2003). La alteración de ATM por la RI, puede ser responsable de cualquier anomalía en la activación múltiple de los puntos de control del ciclo celular e inducir a una reparación defectuosa del ADN. Se ha observado que por acción de la RI no se incrementan los niveles de la proteína ATM, lo que se incrementa o altera es la función cinasa de la proteína (Khanna y col., 1998).

II.14.6. Mecanismo de Acción de la Proteína ATM.

La proteína ATM es una proteína cinasa serina/treonina que después de captar la señal de la ruptura de la doble hebra del ADN ocasionado por la RI, se autofosforila e inicia la cascada de señalización a través de la fosforilación de otros sustratos (Kastan y Lim, 2000). Los sustratos de ATM son reguladores del ciclo celular que se activan en respuesta a la producción de daño en el ADN.

Entre los sustratos se encuentran proteínas como: p53, RPA, Chk2, Chk1, c-Abl, NF-kB y BRCA1 (Angele y Hall, 2000). La mayoría de estos sustratos participan en la reparación de la ruptura de la doble hebra del ADN, la minoría realiza esta función como principal pero además participa en otras funciones para mantener la estabilidad de la célula (Khanna, 2000).

En la cascada de señalización activada por la RI es dirigida principalmente por las proteínas ATM y p53. La proteína ATM es activada en las fases S y G2, y también es requerida en el punto de control G1/S y en la recombinación homologa (Kurz y Lees-Miller, 2004).

La actividad cinasa asociada a la proteína ATM fosforila a una Ser-15 en p53, produciendo un incremento en la concentración intracefular de p53 como consecuencia de tratar de mantener la estabilidad en la célula. También se ha reportado la desfosforilación de la Ser-376 en la porción C-terminal de p53 que es dependiente de ATM (Angele y Hall, 2000). Kastan y col. (1991) observaron la inducción normal de p53 en las células expuestas a la UV y una inhibición de p53 en las células expuestas a la RI. En las células con AT la activación p53 es

mínima, ocasionando alteración en los puntos de control G1/S y G2/M del ciclo celular (Lavin y col., 2004).

La proteína p53 es un activador transcripcional de muchos genes incluyendo el gen WAF1/CIP1, el cual codifica a p21 que es un inhibidor cinasa y desempeña un papel importante en el ciclo celular. La proteína p21 se une al complejo cinasa cdk2-ciclina E y por inhibición de este complejo evita la progresión de la célula de G1 a la fase S, indicando que la proteína ATM está involucrada en el control de la síntesis del ADN (Ko L, 1996).

El complejo heterodimérico RPA es fosforilado en la subunidad 34 Kd por la acción de la proteína ATM. Este complejo es un efector importante en el punto de control en la fase S, que permite la reparación de la ruptura en la doble hebra del ADN, antes de que la célula inicie la replicación del material genético (Khanna, 2000).

La cinasa Chk2 es activada por la proteína ATM y va a fosforilar a p53 en la Ser 20 para favorecer la estabilización de p53 (Matsuoka y Huang, 1998). La expresión de la cinasa Chk1 es dependiente del ciclo celular pero independiente de la proteína ATM, ambas proteínas cinasas Chk1 y Chk2 también son llamadas hCDs1 y actúan como reguladores en el punto de control G2/M del ciclo celular (Angele y Hall, 2000).

Se ha observado que ATM interactúa con una tirosina cinasa c-Abl, que es activada por señales independientes a la radiación como estrés y regula el ciclo celular a través de caminos independientes a p53 (Lavin y col., 2004). La radiación induce a la activación de ATM que junto a c-Abl van a formar un complejo con las proteínas rad51 y rad52, este complejo participa en la reparación del daño al ADN (Khanna, 2000).

Otro blanco para ATM es lkB-a, el cual está asociado con NFkB en el citoplasma, que después de la exposición a la radiación ionizante lkB-a es fosforilado y disociado de NFkB. El NFkB nuevamente entra al núcleo y actúa como un activador transcripcional de varios genes y desempeña un papel importante en la

protección celular contra una variedad de estímulos apoptóticos, también participa en la reparación del daño al ADN, la inhibición de NFkB puede desencadenar la radiosensibilización de la célula (Nanxin y col., 2001). Cortez y col. (1999) han observado que la proteína ATM es requerida para la fosforilación de BRCA1 inducida por la RI.

Las proteínas BRCA protegen al genoma de las consecuencias de la RI, que permiten detener el ciclo celular y promueven la reparación del ADN (Wilson y Elledge, 2002). Son importantes BRCA1 y BRCA2 para mantener la estabilidad genómica a través de la recombinación homóloga, de la trascripción y de la reparación en la doble hebra del ADN, estas funciones sugieren que participan junto a otras proteínas como Rad51 (Venkitaraman, 2001).

La proteína BRCA1 está implicada en la regulación transcripcional de varios genes en respuesta al daño radioinducido al ADN, que incluye a p21 que es un inhibidor ciclina-cinasa y a un supresor de tumores GADD45, estas dos proteínas son los blancos de p53 (Li y col., 1999). Se ha sugerido que BRCA1 regula el ciclo celular mediante la fosforilación, que por su actividad cinasa endógena hiperfosforila al complejo de ciclina cdk2, el cual controla la transición de G1-S, también se ha reportado que participa en la desfosforilación de las proteínas que participan en la fase M del ciclo celular (Ruffner y col., 1999) y que BRCA1 puede detener el ciclo celular en la fase S cuando existe daño en el ADN y participa en el punto de control G2/M (Aprelikova y col., 1999).

La proteína BRCA2 a diferencia de la BRCA1 parece no tener un efecto marcado en el control del ciclo celular (Patel y col., 1998) y el mecanismo como actúa BRCA2 no se conoce bien. Sin embargo algunos autores indican que la BRCA2 está involucrada en la regulación de la progresión de la metafase en la división celular y que de cierta manera desempeña una función importante en la respuesta al daño del ADN (Futamura y col., 2000). Otros autores proponen que la BRCA2 es esencial en la reparación de la ruptura de la doble hebra del ADN (Welcsh y col., 2000). Se ha observado que las células que contienen proteínas truncadas de BRCA2 presentan una acumulación progresiva de aberraciones cromosómicas, que originan estructuras cromosómicas tri y tetrarradiadas (Patel y

col., 1998), que son similares a las observadas en la AF y en el SB que indican los defectos en la recombinación mitótica (Venkitaraman, 2001). En un estudio reciente en el subgrupo FANCD2 de la AF se observó que la proteína BRCA2 está involucrada en la recombinación homóloga en respuesta a la ruptura de la doble hebra del ADN ocasionado por la RI (Stewart y Elledge, 2002). Howlett y col. (2002) encontraron mutaciones bialelicas en el gen de BRCA2 en pacientes con la FA-B y la FA-D1, todas las mutaciones de BRCA2 expresaron proteínas truncadas, por lo que se plantea que los subgrupos de FANCB y FAND1 son el resultado de mutaciones en BRCA2.

La herencia de un alelo defectuoso de BRCA1 y BRCA2 es suficiente para la predisposición de cáncer. Tumores de mama y de ovario muestran pérdida de la heterocigocidad (Collins y col., 1995), indicando que los productos de estos genes deben comportarse como proteínas supresores de tumores (Venkitaraman, 2001). Se han observado mutaciones en los genes de BRCA en las células de mujeres con cánceres primarios múltiples, en las células de cánceres de mama de origen esporádico y en las células de cáncer de mama de mujeres que presentaron antecedentes de cáncer familiar (Wilson y Elfedge, 2002).

La ausencia de la proteína ATM o de afguno de sus substratos puede originar que la lesión subletal del ADN no sea efectivamente reparada y la inactivación de los puntos de control del ciclo celular que son necesarios para reparar el daño celular, ocasionando que se incremente la inestabilidad genómica (Lavin y col., 2004). El mecanismo de acción de la proteína ATM se observa en la figura 4.

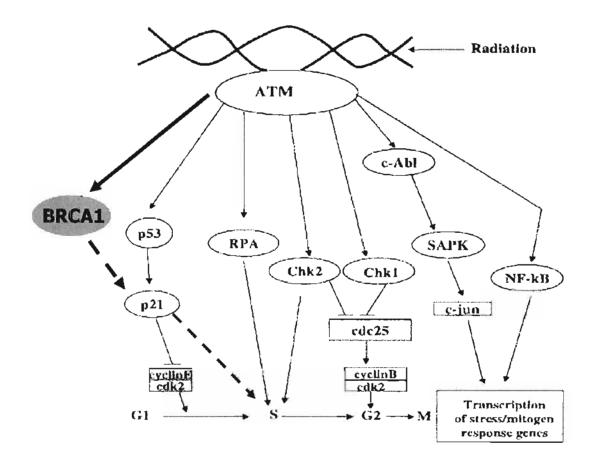


Figura 4. Mecanismo de acción de la proteína ATM (Lavin y Khanna, 1999).

II.14.7. Mecanismo de Activación de la Proteína ATM.

La proteína ATM después de la ruptura de la doble hebra del ADN conduce a una serie de eventos coordinados que ocurren en forma rápida y colectiva para activar a los efectores celulares (Shiloh, 2003). Recientemente se ha planteado el mecanismo de cómo se activa la señalización de la proteína ATM en respuesta a la ruptura de la doble hebra del ADN por la RI.

La proteína ATM se encuentra inactiva en forma dimérica o multimérica, que al captar la señal de la ruptura de la doble hebra del ADN, se autofosforila en la Ser-1981, que permite la activación de ATM y la iniciación de la cascada de señalización de los otros sustratos (Bakkenist y Kastan, 2003). A pesar de que la proteína ATM es esencial en la respuesta de la ruptura de la doble hebra del ADN, participa de manera conjunta con tres componentes proteicos MRE11, RAD50 y NBS1 (Amours y Jackson, 2002), formando el complejo denominado

MRN (Carson y col., 2003). El ATM activo se asocia directamente con el complejo MRN y esta interacción controla la señalización que estará influenciada por el sustrato ATM seleccionado como las histonas H2AX, 53BP1, MDC1 y BRCA1 (Lee y Paul, 2004). De esta manera la proteína ATM y el MRN desempeñan funciones importantes en la respuesta de la ruptura de la doble hebra del ADN (Ball y Xiao, 2005).

Después del daño radioinducido al ADN, estas proteínas se movilizan rápidamente al sitio de la ruptura de la doble hebra del ADN e inician la cascada de señalización dependiente de la proteína ATM, que permite la reparación del daño al ADN o en el caso de daño excesivo, se inicia la muerte celular a través de apoptosis mediada por p53. Todas estas proteínas actúan colectivamente con interdependencia entre ellas, por lo tanto la inactivación de alguna de ellas produce hipersensibilidad a la ruptura de la doble hebra del ADN (McKinnon, 2004). Este mecanismo se observa en la figura 5.

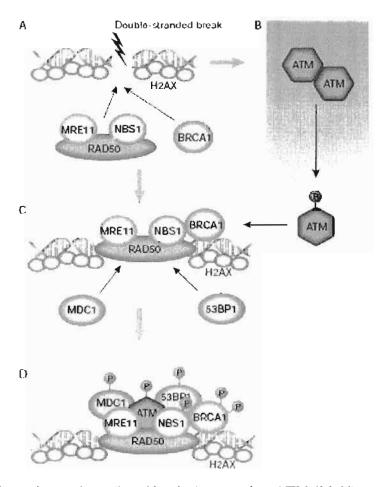


Figura 5. Mecanismo de activación de la proteína ATM (McKinnon, 2004).

II.14.8. Mutaciones en ATM.

Las mutaciones en la proteína ATM originan cambios conformacionales en la estructura, en la activación de la función cinasa o en la alteración de la estabilidad de la molécula primaria. Las mutaciones en la proteína ATM son responsables de las características fenotípicas clásicas en los pacientes con AT (Khanan y col., 1995; Angele y col., 2003).

Las mutaciones en la proteína ATM descritas hasta el momento se han encontrado en más de 300 familias con AT, se han descrito 36 polimorfismos del gen ATM (http://www.vmmc.org/vmrc/atm.htm). En los heterócigos en el gen ATM, el 70% de las mutaciones originan proteínas truncadas, el 30% presentan mutaciones de cambio de sentido y una pequeña fracción presenta mutaciones de tipo inserción/deleción. La mayoría de las mutaciones encontradas en el gen ATM se ubican en el dominio PI3K de la proteína (Khanna, 2000).

En una compilación de tres publicaciones realizada por Lavin y col. (2004) sobre las mutaciones del gen ATM, reportan hasta 75 mutaciones en los pacientes con AT. Varias de las mutaciones encontradas se ubicaron en el marco de lectura del transcrito, en lugares que aparentemente no son puntos calientes (hot spot). También mencionan que ninguna de las mutaciones encontradas era la responsable de la elevada inestabilidad en el transcrito de ATM.

Se ha reportado que en un mismo fragmento del gen ATM se pueden encontrar mutaciones de tipo deleción, inserción o de cambio de sentido (Angele y col., 2003). La mutación más frecuente observada en el gen ATM es de tipo deleción, que transcribe principalmente a las proteínas truncadas, las cuales presentan sus funciones disminuidas o normales, pero con una actividad cinasa notablemente disminuida (Lavin y col., 2004). Las diferentes mutaciones en la proteína ATM son responsables de la severidad de los casos de AT, existiendo versiones mas leves de AT, con una sintomatología menos severa (Stewart y col., 2001).

En un estudio realizado en dos familias británicas se han observado transversiones en 7271 pares de bases que implícan principalmente el reemplazo

de valina por glicina. Estas mutaciones se asociaron con un fenotipo clínico leve, baja radiosensibilidad e incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama en homócigos y heterócigos (Stankovic y col., 1998). En otro estudio en 41 familias nórdicas con AT, evaluaron en 28 familias mutaciones en ambos alelos del gen ATM, en 11 familias se encontró sólo una mutación y en las 2 familias restantes no se identificó ninguna mutación. Encontraron 82 alelos mutados que causan la enfermedad, de los cuales se identificaron 67 alelos (82%), de estos alelos identificados 37 fueron mutaciones únicas. Las mutaciones encontradas presentaron 5 diferencias en el transcrito ATM, observándose mutaciones que afectan el splicing (43%), mutaciones frameshift (32%), mutaciones sin sentido (16%), deleción en un fragmento pequeño (5%) y una doble sustitución (3%). También se observó que una tercera parte de los participantes fueron homócigos, mientras que la mayoría de los participantes fueron heterócigos con al menos un alelo identificado (Laake y col., 2000).

Los estudios de mutaciones en la proteina ATM han permitido correlacionar al genotipo-fenotipo de las poblaciones, la modificación en los genes y/o en la exposición con el medio ambiente puede afectar el fenotipo de AT (Khanan y col, 1995).

II.14.9. ATM y Cáncer de Mama.

Swift y col. (1991) estimaron que, de todos los pacientes con cáncer de mama, del 8% al 18% son heterócigos para el gen ATM. En base a estos antecedentes Angele y Hall (2000) estudiaron a familias AT, encontrando un incremento de riesgo de cáncer de mama en portadoras femeninas heterócigas de ATM de un 3.8%, con un rango del 1 al 13%. Se ha designado al gen ATM como el gen más común de susceptibilidad al cáncer y se reporta que el 5% de los pacientes con cáncer menores de 46 años de edad son heterócigos para este gen (McKinnon, 2004).

En un estudio de frecuencias de cáncer familiar con elevada susceptibilidad al desarrollo de cáncer, no se encontró elevada susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama u otros cánceres. Sin embargo, al evaluar los tumores de mama

esporádicos, la pérdida de heterócigocidad se localizó frecuentemente en la región 11q22-23 del gen ATM (Negrifi y col., 1995). En otro estudio realizado en Francia se reportó un riesgo incrementado de cáncer de mama en heterócigos obligados de AT (Janin y col., 1999). Olsen y col. (2001) estudiaron a familias nórdicas y confirmaron el elevado riesgo de desarrollar cáncer en los pacientes con AT, especialmente de tipo leucemia y linfoma, observaron el incremento del riesgo de desarrollar cáncer en los familiares de los pacientes con AT. De todos los casos de cáncer de mama, sólo algunos casos de cáncer presentaron mutaciones en el gen ATM, sugiriendo que el gen ATM representa un factor de riesgo débil para desarrollar cáncer de mama

Angele y Hall (2000) en una revisión de las investigaciones del gen ATM concluyen que la evidencia apoya que las mutaciones en el gen ATM en las mujeres heterócigas son un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama esporádico y familiar.

II.14.10. Sensibilidad de los Heterócigos del Gen ATM para Desarrollar Cáncer.

Los portadores heterócigos del gen ATM constituyen del 0.35 al 1% de la población mundial (Swift y col, 1976; Bretsky y col., 2003), en EUA se calcula que aproximadamente del 1 al 2% son heterócigos para este gen (Khanna, 2000). Los portadores no presentan la mayoría de los problemas asociados a esta enfermedad, pero se ha reportado que presentan un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, pulmón, estómago, próstata, melanoma y vesícula (Thorstenson y col., 2003; Pierce y Preston, 1996).

El desarrollo de cáncer en heterócigos al gen ATM es muy controversial, debido a que existen publicaciones que caracterizan al gen ATM como responsable del desarrollo de cáncer y existen otras publicaciones en oposición a este planteamiento.

Del grupo de investigadores que han confirmado este planteamiento se encuentra a Swift y col. (1987) quienes realizaron en EUA un estudio retrospectivo de la

incidencia de cáncer en 110 familias de pacientes con AT, reportando que los portadores heterócigos del gen ATM presentaron un riesgo excesivo de desarrollar cáncer, que la mayoría de los casos fueron cáncer de mama y fueron desarrollados por heterócigas. En 1991, estos autores reportaron que el gen ATM predispone a los heterócigos al desarrollo de cáncer, particularmente al cáncer de mama y que la exposición ocupacional o diagnóstica a la RI probablemente incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres heterócigas del ATM.

Athama y col. (1996) estudiaron a 99 familias con AT, encontrando a 33 mujeres con cáncer de mama, 25 de los casos fueron desarrollados por las heterócigas del ATM. Del total de casos con cánceres en mama, 21 de éstos se iniciaron antes de los 60 años y 12 de los casos después de los 60 años, sugiríendo que el gen ATM predispone a los heterócigos de ATM a desarrollar cáncer.

Gatti y col. (2001) han observado dos grupos de heterocigotos del AT en la población en general, un grupo de heterócigos pueden ser producto de una mutación sin sentido que produce una proteína truncada, un segundo grupo que son producto de una mutación de cambio de sentido que son los que presentan predisposición al desarrollo de cáncer de mama esporádico. La sensibilidad observada en los heterócigos de ATM a la RI, probablemente se explique por estos dos grupos de mutaciones. De acuerdo a esta posibilidad, los heterócigos con mutaciones sin sentido expresaran predominantemente ATM silvestre, los heterócigos con mutaciones de cambio de sentido expresaran proteína ATM mutada, que presentara un fenotipo más parecido a un homocigoto (Menéndez y col., 2001).

De los investigadores que no han confirmado este planteamiento mencionamos a Pippard y col. (1988) que evaluaron la mortalidad y la incidencia de cáncer en familias británicas de 67 pacientes con AT, los padres de los enfermos fueron heterócigos obligados y los abuelos presentaron 0.5% de probabílidad de heterocigocidad. En las familias de AT ocurrieron 14 muertes, de los cuales uno murió con linfoma y 3 con cánceres no especificados. Los autores consideran que no existió mortalidad excesiva ocasionada por neoplasias en los padres y abuelos

de los pacientes con AT. FitzGerald y col. (1997) quienes analizaron las mutaciones del gen ATM en las células germinales de mujeres con cáncer de mama de inicio temprano, encontraron pocas mutaciones en el gen ATM y reportaron que la heterocigocidad del ATM no confiere la predisposición al desarrollo de cáncer de mama de inicio temprano.

II.14.11. Evaluación de la Frecuencia de los Micronúcleos en Estudios de Genotoxicidad.

Existen varios parámetros que pueden ser utilizados para la evaluación de los efectos genotóxicos de agentes físicos, químicos y biológicos. Uno de los métodos más empleados en la actualidad debido a su sensibilidad y sencillez, es la determinación de la frecuencia de células con micronúcleos (MN).

Los MN son fragmentos del núcleo celular que se forman como consecuencia de una división cromosómica errónea, que provoca la pérdida de un fragmento de cromosoma o del cromosoma completo, el cual puede incluirse en alguna de las células hijas después de la citocinesis (Fenech, 1997), como se aprecia en la figura 6. La técnica originalmente se desarrolló para la evaluación del daño inducido por la RI, aunque poco después se amplió su uso para el análisis de otros mutágenos (Heddle y col., 1983).

Para el análisis de MN en linfocitos de sangre periférica de seres humanos se emplea una metodología que se basa en el bloqueo de la citocinesis utilizando Citocalasina-B (Cyt-B), lo que permite identificar a las células que se han dividido una vez en cultivo, observándose éstas como células binucleadas, debido al efecto inhibidor de la Cyt-B sobre la citocinesis sin alterar la cariocinesis (Carter, 1967).

Esta técnica se ha convertido en una herramienta muy útil para la detección de daño genético, además de presentar otras ventajas como su rapidez, facilidad y versatilidad, pues es aplicable a diferentes tipos celulares, siendo en algunos casos capaz de sustituir el análisis de aberraciones cromosómicas.

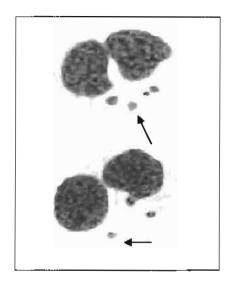


Figura 6. Células binucleadas con micronúcleos (MN), teñidas con Giemsa. Obsérvese los dos núcleos principales y los MN en el citoplasma (flechas) (Fenech y col. 2003).

Los criterios para la identificación de MN en células binucleadas (CBN) aceptados en estudios internacionales son (Fenech y col.; 2003):

- Criterios empleados para identificar CBN.
 - 1. Las células deben ser binucleadas.
 - Los dos núcleos deben presentar una membrana nuclear intacta y debe estar situado dentro del mismo límite citoplasmático.
 - 3. Los dos núcleos deben ser aproximadamente del mísmo tamaño con la misma intensidad de tinción.
 - 4. Los dos núcleos pueden estar unidos por un puente nucleoplasmático fino, el cual no debe ser mayor a ¼ del largo del diámetro nuclear.
 - 5. Los dos núcleos pueden traslaparse, pero debe de distinguirse la membrana nuclear de cada una.

- La membrana citoplasmática debe de ser intacta y claramente distinguible de las células adyacentes.
- Criterios para la identificación de MN.
 - El diámetro de un MN en linfocitos humanos usualmente debe considerarse entre 1/16 y 1/3 del diámetro de las CBN, que corresponde a 1/256 y 1/9 del área de uno de los núcleos de las CBN.
 - 2. Son de forma redonda u oval.
 - No debe de refringir para poder distinguirlos de artefactos como partículas teñidas.
 - 4. No deben estar unidos o conectados al núcleo principal.
 - 5. Debe presentar color e intensidad similares a los del núcleo principal.
 - 6. No debe tocar ninguno de los núcleos.
 - 7. Debe presentar la misma condensación de los núcleos.

III. ANTECEDENTES

Los riesgos a la salud por la exposición a dosis bajas de RI se han determinado principalmente utilizando modelos clásicos lineales, extrapolando de los datos obtenidos de la exposición humana a dosis altas (Little y Muirhead, 2000).

Algunos estudios han presentado evidencias de los efectos a dosis bajas de la RI, con modelos diferentes al modelo lineal, mostrando efectos biológicos con elevada significancia estadística como la inducción de mutaciones en rango de dosis de 0.2, 0.05 y 0.039 Gy (Cropmto y col., 1990; Vilenchick y Knudson, 2000), de MN para dosis de 0.05, 0.1 y 0.2 Gy (Fenech y Morley, 1986; Widel y Prybyszewski, 1998), la transformación cetular para dosis de 0.1 Gy (Hill y col. 1992) y aberraciones cromosómicas para dosis de 0.02 y 0.2 Gy (Lloyd y col., 1992). Estudios realizados a residentes taiwaneses expuestos a dosis entre 0.118 y 0.2 Gy de radiación y en un periodo de 13 a 122 meses, mostraron el incremento significativo de MN en comparación al control y reportaron que las dosis bajas de la RI ocasionan daño a nivel del ADN (Chang y col. 1997). En trabajadores de medicina nuclear expuestos de 1 a 30 años a dosis bajas menores que 0.0629 Gy se encontró la inducción significativa de MN, la cual estuvo influenciada por la edad y diferentes patologías como la diabetes mellitus e hipertensión arterial, entre otras (Joseph y col., 2004). Otro estudio evaluó los efectos de la RI al exponer fibroblastos humanos a dosis de 0.001 a 0.2 Gy de rayos X. Observaron que la RI a dosis bajas ocasiona la ruptura de la doble hebra del ADN y sugieren que la extrapolación de datos obtenidos a dosis altas de la RI subestima significativamente el riesgo de carcinogénesis (Rothkamm y Lobrich, 2003). El riesgo de desarrollar cáncer fue evaluado en trabajadores de plantas nucleares en 15 países, expuestos a dosis de 0.005 a 0.2 Gy de RI, estimándose un riesgo de dos a tres veces mayor al obtenido al extrapolar a partir del modelo clásico lineal los datos obtenidos de los sobrevivientes a la bomba atómica (Cardis y col, 2005).

Se reportó que a dosis bajas de 0.01 a 0.1 Gy la RI puede originar efectos nocivos en el embrión y en el feto, por lo que se clasifica como teratógeno. El riesgo del feto a la exposición de la RI se incrementa en las semanas 8^{va} a la 15 ^{va}, observaron defectos como retraso mental y microcefalia (Pollycove y Maryland, 2001). La probabilidad de inducción de retraso mental es del 40% al 10% por Gy entre las semanas 16 ^{va} a 25 ^{va} del embarazo (Mehta, 2005).

Otras investigaciones del efecto genotóxico de las dosis bajas de la RI muestran resultados diferentes, reportaron que dosis de 0.1 Gy no origina la inducción significativa de mutaciones (Pollycove y Maryland, 2001; Magae y col., 2003) ni de aberraciones cromosómicas (Ghiassi-nejad y col., 2001). Un estudio en trabajadores expuestos a radiaciones γ y X con dosis menores que 0.028 Gy en un periodo de 7 a 21 años, evaluaron la frecuencia de cromosomas dicéntricos en los linfocitos de los trabajadores después de la exposición a una dosis alta de 2 Gy. Observaron bajas frecuencias de cromosomas dicéntricos en comparación al grupo control, reportaron que las dosis bajas originan una respuesta adaptativa a posteriores exposiciones de RI (Barquinero y col., 1995). Thierens y col. (2002) no observaron diferencias significativas de MN en grupos pre y post-exposición a rayos y con dosis de 0.01 Gy. Una revisión de los riesgos en la salud para dosis bajas de RI reportaron que a dosis menores que 0.01 Gy no se pueden estimar exactamente los riesgos por modelos matemáticos, debido a que existen numerosas variables ambientales, biológicas y de la dieta que intervienen. Además, el daño radioinducido en la célula no sólo depende de la dosis, sino también del valor de LET, del tipo de radiación, de las exposiciones previas a mutágenos químicos y biológicos, de los mecanismos de reparación de la célula, entre otros. Los autores reportan que los efectos en la célula, originados por las dosis bajas de la RI, no deben considerarse insignificantes en el desarrollo de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas (Prasad y col. 2004).

La mayoría de los estudios de genotoxicidad con partículas ß fueron realizados a dosis altas, como el presentado por Oliveira y col. (2001) que evaluaron en linfocitos humanos el efecto de la radiación ß del ⁹⁰Sr en un rango de dosis de 0.2 a 5 Gy, observaron varios tipos de aberraciones cromosómicas y concluyeron que la radiación ß induce lesiones en el ADN difíciles de reparar. Broome y col. (2002)

evaluaron en fibroblastos humanos el efecto de las partículas ß de muy baja energía de ³H en un rango de dosis bajas de 0.0001 Gy a 0.2 Gy, las células fueron expuestas a las dosis bajas y posteriormente a una dosis alta de 4Gy.

Observaron poca inducción de MN en el grupo irradiado en comparación al grupo control y comprobaron que la eficacia biológica relativa de la radiación ß de ³H a dosis bajas es 1.

En la evaluación de la sensibilidad de los heterócigos del gen ATM se encontraron diversos estudios con resultados contradictorios. Paterson y col. (1979), no reportaron diferencias en la frecuencia basal de aberraciones cromosómicas en individuos heterócigos del gen ATM, ni en las inducidas por la exposición a RI. Higurashi y Cohen (1973) reportaron el incremento de aberraciones post-irradiación en linfocitos de pacientes con AT. En 1985 Boder reportó que los agentes químicos y físicos como la RI inducían más aberraciones cromosómicas en las células heterócigas del ATM que en células control. En líneas celulares linfoblastoides heterócigas del ATM transformadas con Virus Epstein Barr (VEB) expuestas a RI, se observó una respuesta apoptótica intermedia en comparación al grupo silvestre y homócigo. También se reportó que los resultados de apoptosis difieren cuando se experimenta en linfocitos primarios obtenidos directamente de familias AT (Bebb y col. 2001).

La predisposición genética de desarrollar cáncer radioinducido en los heterócigos de ATM es aun un tema de investigación.

Varios autores han encontrado evidencias de este planteamiento, Swift y col. (1991) reportaron que la irradiación de las glándulas mamarias especialmente en mujeres jóvenes heterócigas para el gen ATM, incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Scott y col. (1999) midieron la radiosensibilidad cromosómica en poblaciones con cáncer, observando un elevado porcentaje de heterócigos en el gen ATM en esta población. En una revisión de las investigaciones en líneas celulares linfoblastoides de pacientes con cáncer de mama, se evaluaron las respuestas de las líneas celulares a la acción de la RI, y reportaron que el gen ATM desempeña un papel importante en la patogénesis del desarrollo del cáncer

de mama esporádico y familiar (Lavin y Khanna, 1999; Angele y Hall, 2000). Sin embargo, otros autores como Pippard y col. (1988) no encontraron evidencias de la predisposición del desarrollo de cáncer en los heterócigos al gen ATM. Resultados similares fueron reportados por FitzGerald y col. (1997) en un estudio realizado en células germinales de mujeres con cáncer de mama de início temprano.

IV. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El análisis de los efectos en la salud de los diferentes tipos de las radiaciones en el sistema biológico es de gran valor, para un mejor entendimiento del potencial mutagénico y carcinogénico de la RI.

Los primeros conocimientos de los efectos negativos de la RI fueron de individuos expuestos a niveles relativamente altos de la RI como las personas expuestas por razones médicas terapéuticas y de los sobrevivientes a las bombas de Hiroshima y Nagasaki (1945) (Kodama y col, 2001; Preston y col, 2003). Se han estudiado ampliamente los efectos en la salud a dosis altas. En cambio, debido a los pocos estudios realizados no se cuenta con información confiable de los efectos de dosis bajas de la RI en seres humanos (denominados estocásticos) (Rothkamm y Lobrich, 2003). Particularmente, la inducción del cáncer y de alteraciones hereditarias, están demostradas a dosis altas, pero las dosis bajas aun son tema de estudio y de controversia. Mientras los organismos dedicados a la protección radiológica utilizan la hipótesis lineal sin umbral, que indica que a dosis bajas, la radiación ionizante tiene la misma probabilidad por unidad de dosis de inducir el desarrollo de cáncer y que el riesgo se incrementa con la dosis recibida (Brenner y col. 2001), diversos autores indican que los riesgos a la salud producidos por la exposición a dosis bajas de la RI no pueden estimarse con precisión.

Los efectos citogenéticos ocasionados por la RI han sido estudiados en su mayoría utilizando partículas a, rayos X y rayos γ. Existe poca información de los efectos ocasionados por las partículas ß en las células humanas (Oliveira y col., 2001). La información brindada por la UNSCEAR sobre el efecto genotóxico del ⁹⁰Sr y su capacidad para inducir cáncer ha sido mínima y se considera a este elemento como poco explorado (UNSCEAR, 2000).

Existen varias enfermedades que predisponen al desarrollo de cáncer denominadas Síndromes de Inestabilidad Cromosómica como la Ataxia Telangiectasia, el Síndrome Bloom, la Anemia de Fanconi, entre otras (Salamanca, 1990). Los pacientes con AT se caracterizan por una elevada

sensibilidad a la radiación ionizante y de presentar predisposición al desarrollo del cáncer (Shiloh, 1995).

Los portadores heterócigos del gen ATM no presentan la mayoría de los problemas asociados a esta enfermedad, pero se ha reportado que presentan un incremento en el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (Thorstenson y col., 2003; Pierce y Preston, 1996), especialmente de mama (Swift y col., 1991). El desarrollo de cáncer en los heterócigos de ATM es muy controversial, debido a que existen publicaciones que caracterizan al gen ATM como responsable del desarrollo de cáncer y existen otras publicaciones que se oponen a este planteamiento.

Interesados por entender los efectos genotóxicos de la RI, y por la controversia existente en la carcinogénesis de dosis bajas de la RI y de la sensibilidad de los heterócigos del ATM al desarrollo de cáncer, decidimos evaluar la sensibilidad individual de las heterócigas del gen ATM expuestas a dosis bajas de RI en las líneas linfoblastoides para el gen ATM con diferentes status genético (silvestres, heterócigas y homóciga).

V. HIPOTESIS

Las líneas celulares linfoblastoides heterócigas para el gen ATM presentarán diferencias en la sensibilidad a los efectos genotóxicos producidas por dosis bajas de RI.

VI. OBJETIVOS

VI.1. General:

Conocer las diferencias en la sensibilidad producidas por dosis bajas de RI en líneas linfoblastoides heterócigas para el gen ATM.

VI.2. Específicos:

- Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad en líneas heterócigas para el gen ATM irradiadas con una dosis baja de RI.
- Comparar la sensibilidad individual que presenten las líneas celulares linfoblastoides a la RI entre ellas y en relación con una línea normal y una homóciga.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. Líneas Celulares.

Se utilizaron líneas celulares linfoblastoides con diferentes estatus genéticos para el gen ATM:

Silvestre	Heteróciga	Homóciga			
+/+	+/-	-/-			
СНОС	RHO /ATH5LA/	JHE /AT11LA/			
2451ª	FBU /AT28LA/				
	L3 /AT36LA/				
	FVA /AT36LA/				
, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	GM14 /GMO8436/				
	МНО				

Cuadro 1. Líneas celulares tinfoblastoides para el gen ATM.

Linfocitos B humanos obtenidos de diferentes donadores AT, heterócigos y un individuo normal inmortalizados con el Virus Epstein Barr (VEB)/ nomenclatura internacional/. Donación del Dr. Richard Gatti (USA - Centro Médico de UCLA).

^a Linea celular obtenida de un individuo sin antecedentes familiares para AT y cuyos linfocitos fueron transformados en el laboratorio con el VEB.

VII.2. Cuantificación del Número Celular.

La población celular se determinó con el ensayo de exclusión por azul tripano (Menéndez, 1997).

VII.2.1. Equipo

Cámara de Neubauer, microscopio óptico Zeiss.

VII.2.2. Procedimiento

La determinación del número de celulares viables se realizó utilizando el colorante azul de tripano (Gibco,BRL), se tomó 20 µl de la muestra celular y se mezcló con 900 µl del medio RPMI-1640 (Sigma) y 80 µl del colorante azul tripano (Gibco, BRL) 0.4%. Las células se contaron en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) y se calculó el porcentaje de células viables (refringentes) y el porcentaje de células muertas (azules); Se contaron las células en un microscopio óptico utilizando el objetivo de 20X.

Se determinó el Número Total de Células (NTC) mediante la formula (Gonzáles, 1990):

NTC (células/ml)= Nº células/4 x 50 x 1/V

Donde:

Nº células= Nº de células contadas en los cuatro cuadrantes.

4 = Nº de cuadrantes de la cámara de Neubauer.

50 = Dilución realizada de la muestra celular en el medio RPMI-1640 (1000:20)

V = Volumen de un cuadrado de la cámara de Neubauer (Q.1 µL = 1X10⁻⁴ mL),

VII.3. Cultivo de las líneas celulares.

VII.3.1. Equipo:

Campana de Flujo Laminar Nuaire Clase II tipo A/B3, incubadora con corriente de CO₂ VWR Scientific Modelo 2400, centrifuga Beckman, microscopio invertido Olympus CK2.

VII.3.2. Procedimiento:

En cajas multipozos estériles (Costar) se cultivaron 350 000 células de cada línea celular en 1.5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado al 10% (v/v) con suero fetal bobino (SFB; Gibco-Invitrogen), 1% de L-glutamina (Sigma),

1% de aminoácidos no esenciales (Sigma) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco-Invitrogen). Se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante el tiempo que se realizó el experimento. En tubos cónicos de polipropileno de 1.5 ml (Eppendorf) se colocó a las células de cada tínea celular en un volumen de 200 µl de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) para realizar la irradiación.

VII.4. Condiciones de Irradiación.

VII.4.1. Equipo.

Se utilizó una fuente radiactíva de Sr⁹⁰-Y⁹⁰ cuya actividad es de 0.5 mCi (medida en agosto de 2002), con dos grupos de partículas ß, con energías máximas de 0.55 y 2.28 MeV, una vida media de 28.7 años. El material utilizado para la construcción del irradiador fue de acrífico, debido a que este material presenta una densidad aproximadamente igual al del agua y es similar a los tejidos biológicos, por su número atómico bajo previene la emisión de rayos X cuando el material es irradiado con partículas beta. La fuente fue calibrada utilizando solución de Fricke (ver anexo 1) y dosímetros TLD-100 (Octubre, 2005). El irradiador fue construido por el Fis. Rodríguez en el Instituto de Investigaciones Nucleares de la UNAM¹, el esquema del irradiador se encuentra en el anexo 2.

La dosis recibida en la muestra biológica será el valor de la dosis nominal ± 4.5%, si usa distancias de irradiación mayores o iguales a 2.6 cm, y 7% si usa distancias de irradiación menores a 2.6 cm (Rodríguez, 2003).

VII.4.2. Procedimiento.

Las líneas celulares linfoblastoides se expusieron a una tasa de dosis de $6.95 ext{ x}$ $10^{-3} \pm 5\%$ Gy/min, a una distancia entre la fuente radiactiva y el tubo de irradiación de $2.0 \pm 5.6\%$ cm y a una dosis total de $0.12 \pm 7.5\%$ Gy. Para poder experimentar con estas condiciones, se corrigió el tiempo de irradiación, de la siguiente manera:

¹ A. Rodriguez Laguna. Diseño, Construcción y Caracterización Dosimetrica de un Irradiador de Bajas Dosis para Muestras Biológicas. Tesis de Licenciatura, director de tesis: Ing. F. Iturbe Hermann.

A.- La ecuación que describe el decaimiento de cualquier fuente radiactiva, está expresada matemáticamente, por la siguiente relación exponencial (Rodríguez, A. 2003):

$$N(t) = N_0 e^{-\frac{\ln 2}{t_{1/2}}t}$$
 (1)

Donde.

N = Número de núcleos radiactivos después de transcurrido un tiempo t.

No = Número de núcleos radiactivos al ínicio.

t % = Vida media de la fuente (28.7 años = 345.48 meses)

t = Tiempo.

En la expresión 1 se puede observar que el termino exponencial funciona como un factor de corrección. A continuación se presenta el valor de dicho factor, para nuestro caso particular:

$$f_c = e^{-2.01x10^{-3} meses^{-1} t}$$

Donde:

 f_c = Factor de corrección.

t = Tiempo medido en meses, que fueron trascurridos desde diciembre del 2002 (construcción del irradiador) a agosto del 2005 (inicio de experimentos) fueron 32 meses.

$$f_c = e^{-2.01x10^{-3} \text{ meses}^{-1}}$$
 (32 meses)
 $f_c = 0.938$

B.- Se determinó el tiempo de irradiación para 0.12 Gy (120 mGy) a una distancia de 2 cm:

- Según la tabla de dosis y tiempos de irradiación necesarios para acumular las dosis (ver anexo 3). Para 100 mGy (0.1Gy) a una distancia de 2 cm se debe de irradiar 13 min 30 s (810 s).
- Para conocer el tiempo de irradiación a 0.12 Gy, se calculó:

$$Z = 972 s$$

C.- Se conoce el factor de corrección (f_c) de decaimiento de la fuente y el tiempo de irradiación a 0.12 Gy (Z), se calculó el Tiempo Corregido de Irradiación (TCI):

TCI =
$$Z/f_c$$

TCI = $972 \text{ s} / 0.936$
TCI = 1038.46 s
TCI = $17 \text{ min } 18 \text{ s}$

D.- De esta manera para una distancia de $2.0 \pm 5.6\%$ cm el tiempo de exposición de las células fue de 17 min 18 s para obtener una dosis de $0.12 \pm 7.5\%$ Gy.

VII.5. Evaluación del Efecto Citotóxico de la Radiación Ionizante.

La citotoxicidad de la RI en las líneas celulares linfoblastoides para el gen ATM se evaluó al determinar el porcentaje de sobrevida celular, utilizando el método diferencial de tinción de diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA/BrEt) (Aeschbacher y col., 1986) que permitió visualizar tanto a células vivas en color verde por el FDA como las muertas en color rojo por el BrEt, al exponerlas a una luz de excitación de 530-550 nm.

VII.5.1. Equipo.

Microscopio Olympus de fluorescencia con luz de 530-550 nm Exitación/590 nm Emisión, espejo dicromático 570 nm.

VII.5. 2. Procedimiento.

La viabifidad con FDA/BrEt se midió en una mezcla de 1:1 (v/v) del resuspendido celular, del cual se tomó una alícuota de 25 µl más 25 µl de una solución que contiene 30 µl de FDA en acetona (5 µg/ml), 200 µl de BrEt en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (200 µg/ml) y 4.8 ml de PBS (ver anexo 4). Esta mezcla fue distribuida homogéneamente sobre una lamínilla y se observó en un microscopio de fluorescencia con un filtro amarillo (MF) utilizando el objetivo 20X, contando 300 células por la señal fluorométrica.

VII.6. Evaluación del Efecto Citostático y Genotóxico de la RI.

Utilizando la técnica de micronúcleos se evaluaron biomarcadores de citotoxicidad y daño al ADN (Fenech, 2000; Gutiérrez y Hall, 2002). Para evaluar el efecto citostático de la RI se determinó el Índice de División Nuclear (IDN) (Fenech, 2000), que se calculó analizando 200 células (N) y se determinó la frecuencia de las células mononucleadas (CMN), binucleadas (CBN) y polinucleadas (CPN).

Se utilizó la siguiente formula:

$$IDN = [CMN + 2 (CBN) + 3 (CPN)] / N$$

Para la evaluación del efecto genotóxico de la RI, se analizó la frecuencia de MN en un total de 1000 CBN por laminilla (Fenech y Crott, 2002).

VII.6.1. Equipo.

Microscopio óptico Olympus, modelo BH2.

VII.6.2. Procedimiento.

A las 24 horas de iniciado el cultivo e inmediatamente después de la exposición a la RI, se adicionó una concentración final de 6µg/ml de Cyt-B (Sigma) de una solución stock de 2 mg/ml en Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a cada cultivo celular. Las células fueron cosechadas a las 48 horas de iniciado el cultivo, por centrifugación (a 1200 rpm por 10 m) y fijadas con metanol/ácido acético glacial (Merk) (3:1). Las células fijadas se colocaron en un portaobjetos frío previamente humedecido con agua, y se colorearon con la tinción Giemsa (Merck). Se inició la evaluación de las células en el microscopio con el objetivo de 100X.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Todos los experimentos fueron realizados por tres veces en pruebas independientes.
- 2. Para la evaluación de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 12.
- 3. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), la prueba de Tukey con el 95% de confianza y la prueba t-Student para determinar la diferencia de medias entre el grupo control y el grupo irradiado de cada línea celular linfoblastoide para el gen ATM.
- 4. Se consideraron valores de *p<0.05 (significativo) y **p<0.01 (altamente significativo).

IX. RESULTADOS

En el presente estudio se utilizaron nueve líneas celulares linfoblastoides del gen ATM, ocho de ellas fueron donadas al laboratorio por el Dr. Richard Gatti. Una fue obtenida transformando con VEB los linfocitos de un donador sin antecedentes familiares de padecimientos genéticos 2451 (+/+).

De las líneas donadas por el Dr. Gatti, la línea CHOC tiene el gen ATM silvestre (+/+), las líneas RHO, FBU, L3, FVA, GM14 y MHO son heterócigas (+/-) y la línea JHE fue obtenida de un paciente que sufría de AT y por lo tanto es homóciga recesiva (-/-). Las líneas celulares MHO y GM14 no proliferaron al cultivarlas. Algunas de las características moleculares de las líneas celulares linfoblastoides para el ATM se presentan en el cuadro 2.

Para determinar las condiciones de irradiación nos basamos en los resultados obtenidos en experimentos anteriores en el laboratorio². Se eligió una dosis de 0.12 Gy para realizar los estudios de citotoxicidad, citostaticidad y genotoxicidad en las diferentes líneas.

Para obtener esta dosis se corrigió el tiempo de irradiación de acuerdo al tiempo de decaimiento del radionúclido (materiales y métodos), determinándose 17 min 18 s como tiempo total de exposición de las células a la fuente radiactiva a la distancia escogida.

² D. Mata López, Susceptibilidad genética a dosis bajas de radiación ionizante, Proyecto de tesís doctoral, directora de tesis: Dra. P. Ostrosky Shejet.

Nombre Común	Estado Genético	Nombre Científico	Mutación	Intrón/Exón	Cambio de nucleótido	Nº Nucleótido	Cambio de Codón	N° Codón	Consecuencias	Pac
RHO	+/-	ATH5LA			: 					
5011	+ (A.T.O.O.I. A	IVS16-10T>G	17	T>G	IVS16-10	INS3	750_	(NS9NT	AT
F8U	+/-	AT28LA	8494C>T	60	C>T	8494	R>C	2832	?	AT
L3	+/-	AT139LA	103C>T	5	C>T	103	R>X	35	T	ΑΤ΄
FVA	+/-	AT36LA	1110DELC	11	DELC	1110	D>X	370	Т	АТ
JHE	-/-	AT11LA	IV\$32-12A>G	32	A>G	IVS32-12	V>I	1538	FS,T	AT

Cuadro 2. Características de líneas celulares linfoblastoides del ATM.

Utilizando la tinción dual de FDA/BtEt se determinaron los efectos de 0.12 Gy en las diferentes líneas celulares que se aprecian en la figura 7.

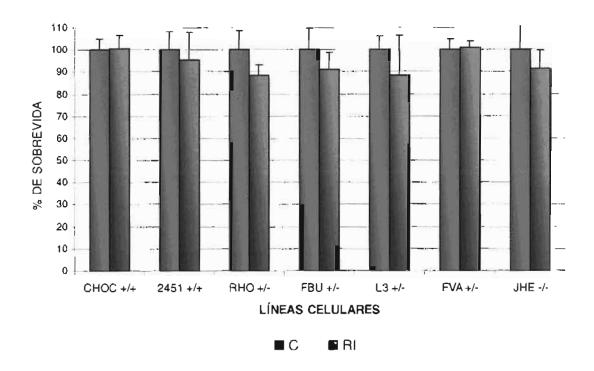


Figura 7. Porcentaje de la sobrevivencia celular con respecto al grupo control (C), de siete líneas linfoblastoides por condición alélica del gen ATM: silvestre (+/+), heteróciga (+/-) y homóciga (+/-) expuestas a la radiación ionizante (RI) de Sr⁹⁰- Y⁹⁰ a una dosis de 0.12 Gy. Cada barra representa el promedio de tres medidas independientes.

La dosis utilizada no produjo una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de la sobrevida celular de los grupos experimentales en comparación a los grupos controles. Las siete líneas celulares presentaron un porcentaje de sobrevida superior al 80%.

En la evaluación del efecto citostático y genotóxico de 0.12 Gy de RI se utilizó la técnica de MN con Cyt-B. Para la determinación del efecto citostático se calculó el

ž

porcentaje de células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas en un total de 200 células y se obtuvo el Índice de División Nuclear (IDN).

La comparación de los IDN del grupo experimental con el grupo control mostró que 0.12 Gy no alteró significativamente el IDN en ninguna de las líneas evaluadas, es decir la dosis de 0.12 Gy no tuvo un efecto citostático en las líneas linfoblastoides, como se observa en la figura 8.

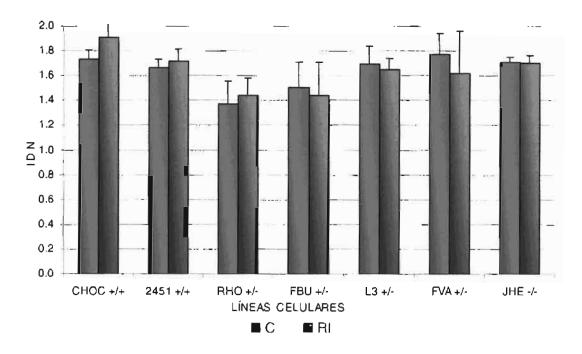


Figura 8. El Índice de División Nuclear con respecto al grupo control (C), de siete líneas linfoblastoides por condición alélica del gen ATM: silvestre (+/+), heteróciga (+/-) y homóciga (+/-) expuestas a la radiación ionizante (RI) de Sr⁹⁰-Y⁹⁰ a una dosis de 0.12 Gy. Cada barra representa el promedio de tres medidas independientes.

Para evaluar la genotoxicidad se determinó el número de MN en 1000 células binucleadas por línea celular y se comparó el grupo experimental con el grupo control. Aunque tuvo un incremento en la frecuencia de MN en las líneas silvestres (+/+) CHOC y 2451 para el gen ATM no fue significativo. En las líneas heterócigas (+/-) el comportamiento fue heterogéneo, se observó que FBU

?

presentó una diferencia significativa de los MN (p<0.05) y RHO una diferencia altamente significativa de los MN (P<0.01). Sin embargo, en las otras dos líneas heterócigas L3 y FVA no se observaron diferencias en la inducción de los MN. En la línea homóciga recesiva (-/-) JHE se aprecia una diferencia altamente significativa de MN (p<0.01).

Esto nos indica que las líneas silvestres no fueron sensibles al efecto genotóxico de la RI, la línea celular homóciga y dos de las líneas heterócigas para el gen ATM fueron sensibles al efecto genotóxico de las partículas β a una dosis baja de 0.12 Gy, tal como se observa en la figura 9.

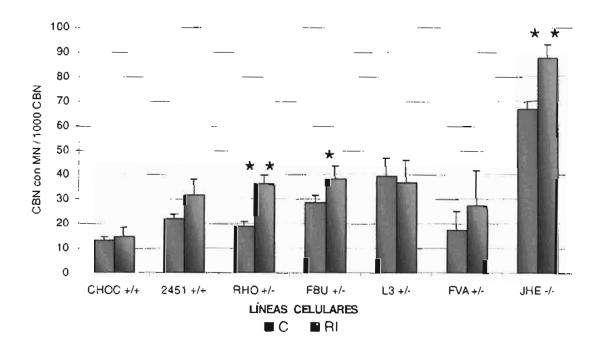


Figura 9. Frecuencia de micronúcleos (MN) en 1000 células binucleadas (CBN) con respecto al grupo control (C), de siete líneas linfoblastoides por condición alélica del gen ATM: silvestre (+/+), heteróciga (+/-) y homóciga (+/-), expuestas a la radiación ionizante (RI) de Sr⁹⁰-Y⁹⁰ a una dosis de 0.12 Gy. Cada barra representa el promedio de tres medidas independientes (*p<0.05) y (**p<0.01).

7

X. DISCUSIÓN

Existe una gran cantidad de información de los efectos en la salud ocasionados por la RI, particularmente en la inducción del cáncer y de efectos hereditarios. A nivel celular la RI es capaz de causar mutaciones puntuales y rompimientos cromosómicos en cualquier fase del ciclo mitótico o meiótico, por lo que se le ha clasificado como un agente mutagénico y carcinogénico (Brandan y col., 1991).

La RI afecta al ciclo celular en los puntos de control G1/S y G2/M, la situación más critica se ha observado en la fase G1 ya que la célula irradiada no se detiene a reparar antes de una nueva replicación, dando como resultado una replicación defectuosa en el ADN y como consecuencia inestabilidad cromosómica (Kastan y col., 1992; Morgan y Kastan, 1997).

Diversas investigaciones han brindado la estimación del riesgo relativo de la exposición a dosis altas y a dosis bajas de RI (Rothkanm y Lobrich, 2003). La estimación de los daños a la salud producidos por la exposición a dosis bajas se basó en extrapolar los datos obtenidos a dosis elevadas, utilizando el modelo lineal sin umbral (Muller, 1954). Este modelo asume que la respuesta celular, incluyendo la reparación del ADN, opera eficientemente igual a dosis altas y a dosis bajas de la RI (UNSCEAR, 2000). Posteriormente la ICRP rechazó este modelo, debido a que no era el modelo más adecuado para reflejar los efectos en la salud de dosis bajas. Actualmente se plantean varios modelos mediante los cuales se pretende predecir los efectos en la salud de dosis bajas de RI (Brenner y col., 2003; Pierce y Preston, 1996).

En el presente estudio se evaluaron los efectos de dosis bajas de las partículas ß, para ello se utilizó una fuente radiactiva de Sr⁹⁰-Y⁹⁰. El isótopo radiactivo Sr⁹⁰ se utiliza en radioterapia para el tratamiento de algunas lesiones cutáneas superficíales (Vulpis, 1984), es inestable y decae en Y⁹⁰, a través de partículas ß negativos (electrones), que son consideradas de baja transferencia lineal de energía (LET) y causa ligera ionización en su trayectoria. Sin embargo, la información sobre el efecto genotóxico de este radioelemento es insuficiente.

Como modelo celular utilizamos a la Ataxia Telangiectasia (AT), que es un Síndrome de Inestabilidad Cromosómica (SIC), al igual que el Síndrome de Bíoom, Síndrome de Nijmegen, Anemia de Fanconi, entre otros. Las condiciones homócigas y heterócigas de los SIC permiten establecer gradientes de sensibilidad ante el tratamiento con agentes químicos y físicos (RI) con respecto a la naturaleza alélica normal de los genes.

Las células derivadas de los pacientes con AT se caracterizan por su extrema sensibilidad a la RI, por lo cual constituyen un modelo adecuado para evaluar los efectos genotóxicos de dosis bajas de radiación ionizante.

En el presente estudio planteamos evaluar las diferencias en la sensibilidad a los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de dosis bajas de partículas ß, utilizando como modelo de estudio a las líneas linfoblastoides del gen ATM: silvestre (+/+), heteróciga (+/-) y homóciga (-/-).

Nuestros resultados en la prueba de sobrevida celular y de proliferación celular (IDN) mostraron que el tratamiento con 0.12 Gy no tuvo efectos citotóxicos ni citostáticos en ninguna de las líneas celulares linfoblastoides evaluadas.

La misma dosis no indujo un incremento en la frecuencia de MN en las líneas silvestres (+/+), pero la línea homóciga recesiva (-/-) mostró un incremento significativo en la cantidad de MN (p<0.01). De manera interesante, de las cuatro líneas heterócigas (+/-) únicamente en dos de éstas (FBU y RHO), se observó la inducción significativa de MN (p<0.05 y p<0.01 respectivamente).

Los datos obtenidos muestran, como era de esperarse, que la línea homóciga recesiva (-/-) tenga una alta sensibilidad a la RI. Sin embargo, también dos de las líneas celulares linfoblastoides heterócigas en el gen ATM mostraron ser sensibles a la dosis baja utilizada de RI. Estas diferencias en la sensibilidad al efecto de la RI se deben a que en las células homócigas recesivas, como bien se sabe, ATM no es funcional. En el caso de los heterócigos se hace evidente que en dos de las líneas ATM sí es funcional mas no en las que se comportan como si fueran homócigas recesivas.

En los pacientes con AT (-/-) se ha observado que la inestabilidad genómica origina la alta sensibilidad a la RI (Kastan y col., 1992; Beamish y col., 1996) y que al ser expuestas a RI sus células exhiben un elevado nivel de MN cuando se comparan con las células control (Halozonetis y Shiloh, 1999), sugiriendo que la pérdida del ATM es la responsable de la inestabilidad genética y consecuente del desarrollo de cáncer (Gattì y col., 2001).

Las diferencias en la sensibilidad de las líneas celulares heterócigas de ATM al efecto genotóxico de la RI, se pudieran explicar por diferencias en el tipo de mutación, que origina cambios conformacionales en la estructura, en la activación de la función cinasa o en la estabilidad de la proteína ATM (Khanan y col., 1995; Angele y col., 2003). La mutación más frecuente observada en ATM es de tipo deleción, que transcribe principalmente proteínas truncadas (Lavin y col., 2004).

Es importante mencionar que los heterócigos del ATM fenotípicamente no presentan alteraciones en las funciones reguladas por ATM, aunque sí tienen predisposición a ciertos tipos de cáncer (Easton, 1994) y consideramos que los individuos heterócigos con mutaciones similares a las que tiene (RHO), podrian ser los de más alto riesgo para desarrollar cáncer.

Barquinero y col. (1993) encontraron un efecto lineal entre la dosis y el número de cromosomas dicéntricos al utilizar dosis mayores que 0.1 Gy, observaron diferencias interindividuales en sus muestras y reportaron que éstas posiblemente se deban a la susceptibilidad individual y a diferencias en la capacidad de activación de las enzimas de reparación del ADN. En otro estudio Menéndez y col. (2001) encontraron que las células heterócigas eran las más sensibles a los efectos citotóxicos del As y que existieron diferencias en las curvas de sobrevida de las heterócigas evaluadas, indicando diferencias individuales en la sensibilidad.

A los portadores heterócigos del gen ATM (0.35 - 1% de la población) se les asocia con una elevada sensibilidad a la RI, y con una alta predisposición al cáncer (Thorstenton y col., 2003; Pierce y Preston, 1996). La sensibilidad de los heterócigos del ATM sugiere la haploinsuficiencia de ATM, que es lo que promueve la oncogénesis (Lavin y col., 2004).

Gattí y col, (2001) propusieron que la susceptibilidad al desarrollo de cáncer pudiera estar relacionada con la existencia en la población de dos grupos de heterócigos para el gen ATM y por lo tanto dos fenotipos proteícos distintos. Se ha determinado que dentro del grupo ATM heterócigo, una población presenta mutaciones sin sentido que resultan en la síntesis de una proteína truncada o incompleta, la segunda población son producto de una mutación de cambio de sentido, que son los que presentan mayor predisposición al cáncer radioinducido.

El riesgo de los individuos heterócigos de sufrir cáncer es aun tema de debate. Mientras que algunos autores como Gatti y col. (2001), Swift y col. (1991), Athama y col. (1996) y Angele y Hall (2000) presentan evidencias de la sensibilidad de los heterócigos del gen ATM, al desarrollo de cáncer radioinducido, especialmente al desarrollo de cáncer de mama, otros autores como Pippard y col. (1988) y FitzGerald y col. (1997) no encuentran predisposición genética para el desarrollo de cáncer radioinducido.

Los datos obtenidos en el estudio plantean el que células provenientes de algunos individuos heterócigos en el gen ATM pueden ser más sensibles a los efectos genotóxicos de dosis bajas de radiación ionizante y que entre los individuos heterócigos existen diferencias individuales en la sensibilidad a los efectos genotóxicos.

No sabemos cuales son las consecuencias de estas diferencias a nivel clínico. Sin embargo, queda claro que es necesario conocer mejor estos efectos ya que sería biológicamente posible que los individuos heterócigos sean más sensibles a la inducción de daño genotóxico por las dosis bajas de RI que se emplean en el diagnóstico como en el caso de la mamografía y que su utilización repetida pudiera representar, más que una detección temprana, la inducción de transformación maligna para los individuos sensibles.

Es importante señalar que la dosis utilizada en nuestro estudio fue de 0.12 Gy, que es 40 veces más que la dosis utilizada en una mamografía que es de 0.003 Gy por exposición. En el caso de radiografías de tórax se utilizan dosis de 0.0015 Gy (proyección lateral) y 0.0004 Gy (proyección posteroanterior) que

representarían 80 y 300 veces menos respectivamente, en comparación a la dosis utilizada en este estudio (NOM 157-SSA1, 1996; Parry y col.,1999).

Cabe mencionar que en muchos casos las pruebas diagnósticas radiológicas no se realizan una sola vez, y que los efectos de la radiación son acumulativos. Por lo que, se requieren estudios que evalúen los efectos a exposiciones repetidas. Además en el presente estudio se estudiaron sólo cuatro líneas linfoblastoides heterócigas, que mostraron diferente sensibilidad a los efectos genotóxicos de las partículas ß a dosis de 0.12 Gy. Es evidente que se requiere evaluar un mayor número de muestras que pudieran indicar una mayor variabilidad y la existencia de una sensibilidad a dosis bajas de RI, equiparables a las utilizadas por los diversos métodos de diagnóstico radiológico.

XI. CONCLUSIONES

Por el análisis y discusión de los resultados expuestos en la presente tesis, las conclusiones a las que se pudieron llegar son las siguientes:

- La irradiación con 0.12 Gy de partículas ß no produjo alteración en la viabilidad, ni en la proliferación celular de las líneas linfoblastoides silvestres, heterócigas y homócigas para el gen ATM.
- 2. La irradiación con 0.12 Gy de partículas ß no indujo daño genotóxico en las líneas linfoblastoides silvestres CHOC (+/+), 2451 (+/+) y en dos de las líneas heterócigas L3 (+/-), FVA (+/-). En la línea homóciga recesiva JHE (-/-), al igual que en dos de las líneas heterócigas RHO (+/-) y FBU (+/-), se indujo daño altamente significativo (p<0.01).</p>
- 3. Los datos obtenidos muestran que con respecto a la genotoxicidad inducida por dosis bajas de RI las células heterócigas pueden comportarse en forma similar a células silvestres o como células homócigas recesivas y que éstas serán más sensibles a dosis bajas de radiación ionizante.

XII. REFERENCIAS

Aeschbacher, M. Reinhardt, C. and Zbinden, G. 1986. A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and for cytometry. Cell Biol. Toxicol. 2: 247-255.

Alberts, B. Johnson, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. and Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4TH Ed. New York, NY: Garland Pub. 1463 p.

Amours, D. and Jackson, S. 2002. The Mre 11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3: 317-327.

Angele, S. and Hall, J. 2000. The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor? Mutat. Res. 462: 167–178.

Angele, S. et al. 2003. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association whit breast cancer risk and clinical radiosensibility. Cancer Res. 63: 8717-8725.

Aprelikova, O. et al. 1999. BRCA-associated growth arrest is RB-dependent. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 11866–11871

Athama, P. Rappaport, R. and Swift, M. 1996. Molecular genotyping shows that ataxia telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. Cancer Genet Cytogenet. 92: 130-4.

Bakkenist, C. and Kastan, M. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimmer dissociation. Nature 421: 499-506.

Ball, L. and Xiao, W. 2005. Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases. Acta Pharmacol. Sinica. SK Canada 26: 897-907.

Barlow, C. Liyanage, M. Moens, PB. Deng, CX. Ried, T. and Wynshaw-Boris, A. 1997. Partial rescue of the prophase I defects of Atm-deficient mice by p53 and p21 null alleles. Nat. Genet. 17: 462-466.

Barquinero, J. Barrios, L. Caballón, M. Miro, R. Ribas, M. Subias, A. and Egozcue, J. 1993. Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. Mutat. Res. 286: 275-279.

Barquinero, J. Barrios, L. Caballón, M. Miro, R. Ribas, M. Subias, A. and Egozcue, J. 1995. Ocupational exposure to radiation induces an adaptative response in human lymphocytes. Int. J. Radiat. Biol. 67: 187-191.

Beamish, H. and Lavin, M. 1994. Radiosensibility in ataxia telangiectasia: anomalies in radiation induced cell cycle delay. Int. J. Radiat. Biol. 65: 175-184.

Beamish, H., Williams, R. Chen, P. and Lavin, M. 1996. Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia telangiectasia postirradiations. J. Biol. Chem. 271: 20486-20493.

Bebb, D. Warrington, P. Jong, G. Yu, Zhe, et al. 2001. Radiation induced apoptosis in ataxia telangiectasia homozygote, heterozygote and normal cell. Mutat. Res. 476: 13-20.

Becker-Catania, S. Chen, G. Hwang, M. Wang, Z. Sun, X. Sanal, O. Bernatowska-Matusziewicz, E. Chessa, L. Lee, E. and Gatti, R. 2000. Ataxia telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity. Mol. Genet. Metabol. 70: 122-133.

Boder, E. 1985. Ataxia-telangiectasia: an overview. *In*: R. A. Gatti (ed.), Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a Degenerative Disease of Childhood. New York. Alan R. Liss: 1–63.

Brandan, M. E. Díaz, R. y Ostrosky, P. 1991. La radiación al servicio de la vida. SEP, FCE, CONACYT, La ciencia desde México/99. 3TH Ed. México D.F. 128 p.

Brenner, D. Little, J. and Sachs, R. 2001. The bystander effect in radiation oncogenesis: II. A quantitative model. Radiat. Res. 155: 402–408.

Brenner, D. Doll, R. Goodhead, D. Hall, E. Little, J. Lubin, J. Preston, D. Preston, J. Puskin, J. Ron, E. Sachs, R. Samet, J. Setlow, R. and Zaider, M. 2003. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. Proc. Nat. Acad. Sci. 25: 13761–13766.

Brenner, D. and Elliston, C. 2004. Estimated radiation risks potentially associated with full-body CT screening. Radiol. 232: 735-738.

Bretsky, P. Haiman, C. Gilad, S. Yahalom, J. Grossman, A. Paglin, S. Van Den Berg, D. Kolonel, L. Skaliter, R. and Henderson, B. 2003. The relationship between twenty missense ATM variants and Breast Cancer Risk. The multiethnic Cohort. Cancer Epidemiol. Biomark. Prevent. 12: 733-738.

Broome, E. Brown, L. and Mitchel, J. 2002. Dose response for adaptation to low dose of ⁶⁰Co γ rays and ³H ß particles in normal human fibroblasts. Radiat. Res. 158: 181-186.

Cardis, E. Vrijheid, M. Blettner, M. Gilbert, E. Hakama, M. Hill, C. Howe, G. Kaldor, J. Muirhead, CR. Schubauer-Berigan, M. Yoshimura, T. et al. 2005. Risk of cancer after low doses of ionizing radiation: retrospective cohort study in 15 countries. BJM. 331: 77-79.

Carson, C. Schwartz, R. Stracker, T. Lilley, C. Lee, D. and Weitzman, M. 2003. The Mre11 complex is requirement for ATM activation and the G(2)/M checkpoint. EMBO. 22: 6610-6620.

Carter, S. 1967. Effects of cytochalasin on mammalian cells, Nature 213: 261-264.

Chang, W. Hwang, B. Wang, J. and Wang, D. 1997. Cytogenetic effect of chronic low dose, low rate gamma radiation in residents of irradiated buildings. Lancet 350: 330-333.

Chang, R. 1998. Química. 6THEd. Mc Graw-Hill Interamericana. 995 p.

Cleaver, J. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. Nature 218: 652-656.

Cohen, M. and Simpson, S. 1983. The effect of bleomycin on DNA synthesis in ataxia telangiectasia lymphoid cells. Environ. Mut. 4: 27-36.

Collins, N. McManus, R. Wooster, R. Mangion, J. Seal, S. Lakhani, S. Ormiston, W. and Daly, P. 1995. Consistent loss of the wild-type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13. Oncogene 10: 1673-1675.

Cortez D. Wang Y. and Qin S. 1999. Requirement of ATM dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double strand breaks. Science 286: 1162-1166.

Crompton, N. Barth, B. and Kiefer, J. 1990. Inverse dose rate effect for the induction of 6-thioguanine resistant mutations in Chinese hamster V79-S cell by 60 Co γ rays. Radiat. Res. 124: 300-308.

Cuncliffe, P. Mann, J. and Cameron, A. 1975. Radiosensitivity in ataxia-telangiectesia. Br. J. Radiol. 48: 374-376.

Digweed, M. 2003. Response to environmental carcinogens in DNA-repair-deficient disorders. Toxicol. 193: 111-124.

Easton, D. 1994. Cancer risk in Ataxia telangiectasia heterozygotes. Int. J. Radiat. Biol. 66: 177-182.

Fenech, M. and Morley, A. 1986. Cytokinesis block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo again and low dose X-irradiation, Mutat. Res. 161: 193-198.

Fenech, M. 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis block micronucleus method. Mutat. Res. 392: 11-18.

Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutat. Res. 455: 81-95.

Fenech, M. and Crott, J. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds incident in folic acid deficient human lymphocytes evidence for breakage fusion bridge cycles in the cytokinesis block micronucleus assay. Mutation Res. 504: 131-136.

Fenech, M. Chang, W. Kirsch-Volders, M. Holland, N. Bonassi, S. and Zeiger, E. 2003. HUMN proyect: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. Mutat. Res. 534: 65-75.

FitzGerald, M. Bean, J. Sanjay, R. Hedge, H. Deborah, J. MacDonald, H. Dianne M. Finkestein, I. and Haber, T. 1997. Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. Nat. Genet. 15: 307-310.

Ford, M. and Lavin, M. 1981. Ataxia telangiectasia: an anomaly in ADN replication after radiation. Nucleic. Acid. Res. 9: 1395-1404.

Frischknecht, R. Braunschweig, A. Hofstetter, P. and Suter, P. 2000. Human health damages due to ionizing radiation in life cycle impact assessment. Environ. Imp. Assess. Rev. 20: 159–189.

Futamura, M. Arakawa, H. Matsuda, K. Katagiri, T. Saji, S. Miki, Y. and Nakamura, Y. 2000. Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1. Cancer Res. 60: 1531-1535.

Gatti, R. Boder, E. Vinters, R. and Sparkes, A. Norman, K. Large, K. 1991. Ataxia telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. Medic. 70: 99-117.

Gatti, R. et al. 2001. The pathogenesis of ataxia telangiectasia, learning from Rosetta stone. Clin. Rev. Allergy Imnunol. 20: 87-108.

Ghiassi-nejad, M. Mortazavi, S. Cameron, J. Niroomand-rad, A. and Karma, P. 2001. Very high background radiation areas of Ramsar, Iran: preliminary biological studies and possible implications. Healt. Phys. 82: 87-93.

Gonzáles, J. 1990. Tecnología y métodos del laboratorio clínico. Salvat Editores S.A. España. pp: 70-73.

Greening, J. 1981. Fundamentals of radiation dosimetry. Medical physics Handbook 6. University of Edinburgh and South East Scotland Health Boards. Printed in Great Britain by Page Bros (Norwich) Ltd. USA. pp. 19-67.

Gumy, A. Pause, F. Wacker, P. and Sappino, A. 2004. ATM gene and lymphoid malignancies. Leukemia. 18: 238-242.

Gutiérrez, S. and Hall, J. 2002. Use of the cytokinesis-block micronucleus assay to measure radiation-induced chromosome damage in lymphoblastoid cell lines. Mutat. Res. 535: 1-13.

Hall, E. 1994. Radiobiology for the Radiologist. 4THEd. Copyringht. by J.B. Lippincott Company. USA. 478 p.

Halozonetis, T. and Shiloh, Y. 1999. Many faces of ATM: Eight International Workshop on Ataxia-Telangiectasia. Biochim. Biophys. 1442R: 45-55.

Heddle, J. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. MacGregorr, G. New ell, and Salamone, M. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res. 123: 61-118.

Higurashi, M. and Cohen, E. 1973. In vitro chromosomal radiosensitivity in chromosomal breakage syndromes. Cancer. 32: 380-383.

Hill, C. Han, A. and Elkind, M. 1992. Fission spectrum neutrons at low dose rate enhance neoplastic transformation in the linear, low dose region (0-10cGy). Int. J. Radiat. Biol. 46: 11-15.

Howlett, G. Taniguchi, T. Olson, S. Cox, B. Waisfisz, Q. De Die-Smulders, C. Persky, N. Grompe, M. Joenje, H. Pals, G. Ikeda, H. Fox, E. and DAndrea, D. 2002. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. Science, 297: 606-609.

ICRU 60. 1998. Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation, ICRU Report 60.

(ICRP) International Commission on Radiological Protection: Recommendations. 1991. ICRP publication No. 60. New York, Pergamon Press.

(ICRP) International Commission on Radiological Protection: Recommendations. 1998. Genetic Supceptibility to Cancer. Publication 79 Stockholm.

Iturbe, F. Gamboa, I. y col. 2005. Protección Radiológica, Curso para personal ocupacionalmente expuesto (capacitación para el uso de fuentes abiertas y selladas). Instituto de Ciencias Nucleares-UNAM. México. 227 p.

Janin N, Andrieu K, et al. 1999. Breast cancer risk in ataxia telangiectasia (AT) heterozygotes: haplotyple study in French AT families, Br. J. Cancer 80: 1042-1045.

Joseph, L. Patwardhan, U. and Samuel, A. 2004. Frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes from subjects occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. Mutat. Res. 564: 83-88.

Kastan, M. Oneykwere, O. Sidransky, D. Volgelstein, B. and Craig, R. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res. 51: 6304-6311.

Kastan, M. Zhan, Q. El-Deiry, W. Carrier, F. Jacks, T. Walsh, W. Plunkett, B. Vogelstein, B. and Fornace, A. 1992. Mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell 71: 587–597.

Kastan, M. and Lim, D. 2000. The many substrates and functions of ATM. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 179-186.

Khan, F. 2003. The Physics of Radiation Therapy, 3THEd. by LIPPINCOTT WILLIAMS &WILKINS. USA. pp: 23-45.

Khanan, K. Beamish, H. Yan, J. Hobson, K. Williams, R. Duna, I. and Lavin, M. 1995. Nature of GS/1 cell cycle checkpoint defect in ataxia telangiectasia. Oncogene 11: 609-618.

Khanna, K. Keating, K. Kozlov, S. Scott, S. Gatei, M. Hobson, K. Taya, Y. Gabrielli, B. Chan, D. Lees-Miller, S. and Lavin, M. 1998. ATM associates with and phosfhorylates p53: mapping the region of interaction. Nat. Genet. 20: 398-400.

Khanna, K. 2000. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. J. Nat. Cancer Inst. 92: 795-802.

Ko L, P. 1996. p53: Puzzle and paradigm. Genes dev. 10: 1054-1072.

Kodama, Y. Pawel, D. Nakamura, N. Preston, D. Honda, T. Itoh, M. Ohtaki, K. Funamoto, S. and Awa, A. 2001. Stable chromosome aberrations in atomic bomb survivors: results from 25 years of investigation. Radiat. Res.156: 337-346.

Kurz, E. and Lees-Miller, S. 2004. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. DNA Repair (Amst) 3: 889-900.

Laake, K. Jansen, L. Hahnemann, J. Brondum, K. et al. 2000. Characterization of ATM mutations in 41 Nordic Families whit Ataxia Telangiectasia. Hum. Mutat. 16: 232-246.

Lavin, M. 1999. The product of the gene mutated in ataxia telangiectasia. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31: 735-740.

Lavin, M. and Khanna, K. 1999. Review: ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. Int. J. Radiat. Biol. 75: 1201-1214.

Lavin, M. Scott, S. Gueven. N. Kozlov, S. Peng C. and Chen. P. 2004. Functional consequences of sequence alterations in the ATM. DNA Repair 3: 1197-1205.

Lee, J. and Paul, T. 2004. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. Science 304: 93-96.

Lefton-Greif, M. Crawford, T. Winkelstein, J. Loughlin, G. Koerner, C. Zahurak, M. and Lederman, H. 2000. Oropharyngeal dysphagia and aspiration in patients with ataxia telangiectasia. J. Ped 136: 225-231.

Li, S. Chen, P. Subramanian, T. Chinnadurai, G. Tomlinson, G. Osborne, C. Sharp, Z. and Lee, W. 1999. Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. J. Biol. Chem. 274: 11334-11338.

Little, P. and Muirhead, C. 2000. Derivation of low dose extrapolation factors for analysis of curvature in the cancer incidence dose response in Japanese atomic bomb survivors. Int. J. Radiat. Biol. 76: 935-939.

Lloyd, D. Edwards, C. Leonard, A. Deknudt, G. Verschaeve, L. Natarajan, A. Darroudi, F. Obe, G. Palitti, F. Anzarella, C. and Twan, E. 1992. Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low dose of X-rays. Int. J. Radiat. Biol. 65: 683-690.

Loeffler, J. Kooy, H. Wen, P. Fine, H. Cheng, C. Mannarino, E. Tsai, J. and Alexander, J. 1990. The treatment of recurrent brain metastases with stereotactic radiosurbery. J. Clin. Oncol. 8: 576-582.

Magae, J. Hoshi, Y. Furukawa, C. Kawakami, Y. and Ogata, H. 2003. Quantitative analysis of biological response to ionizing radiation, including dose, irradiation time, and dose rate. Radiat. Res. 160: 543-548.

Mata López D. 2001. Susceptibilidad genética a dosis bajas de radiación ionizante, proyecto para ingresar al doctorado en Ciencias Biomédicas. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. México.

Matsuoka, S. and Huang M. 1998. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. Science 282: 1893-1897.

McKinnon P. 2004. ATM and ataxia telangiectasia. EMBO. 5: 772-776.

Mehta, S. 2005. Health risk of low level radiation exposures: a review. Indian J. Nucl. Med. 2: 29-39.

Menéndez, D. 1997. Efecto del arsenito de sodio sobre el gen supresor de tumores p53. Tesis de Licenciatura. IIB UNAM. D.F-México. pp. 23-67.

Menéndez, D. Mora, G. Salazar, A. and Ostrosky, P. 2001. ATM status confers sensitivity to arsenic cytotoxic effects. Mutagenesis.16: 443-448.

Meyn, M. 1995. Ataxia Telangiectasia and cellular responses to DNA damage. Cancer Res. 55: 5591-6001.

Morgan, K. and Turner, J. 1967. Principles de Radiation Protection. A textbook of health physics. John Wiley and Sons, Inc. USA-NY. 435 p.

Morgan, S. and Kastan, M. 1997. p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. Adv. Cancer Res. 71: 1–25.

Morrell, D. Chase, CL. Kupper, LL. and Swift, M. 1986. Diabetes mellitus in Ataxia telangiectasia, Fanconi anemia, Xeroderma pigmentosum, common variable immune

deficiency, and severe cabinet immune deficiency, and severe combined immune deficiency families. Diabetes 35: 143-147.

Motoyama, N. and Naka, K. 2004. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. Curr. Opin. Genet. Dev. 14: 11-16.

Muller, H. 1954. The manner of dependence of the permissible dose of radiation on the amount of genetic damage. Acta Radiol. 41: 5-20.

(NCRP) National Council on Radiation Protection and Measurement, 1987. Recommendations on limits for exposure to ionizing radiation. Report no. 91. Bethesda, MD, with permission.

Nanxin, L. Banin, S. and Ouyang, H. 2001. ATM is required for IkB Kinase (IKK) activation in response to DNA double strand breaks. J.Biol. Chem. 276: 8898-8903.

Negrifi, M. Rasi, D. Hampton, M. et al. 1995. Definition and refinement of chromosome 11 regions of loss of heterozygosity in breast cancer: identification of a new region at 11g23.3. Cancer Res. 55: 3003-3007.

Norma Oficial Mexicana NOM 157-SSA1-1996. Salud Ambiental. Protección y Seguridad Radiologica en el Diagnostico Médico con rayos X.

Oliveira, E. Suzuki, M. Nascimento, P. Silva, M. and Okazaki, K. 2001. Evaluation of effect of ⁹⁰Sr ß-radiation on human blood cells chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. Brazil. Mutat. Res. 476: 109-121.

Olsen, J. Johanne, M. Hahnemann, A. Borresen-Dale, A. Brondum-Nielsen, K. Hammarstrom, L. Kleinerman, R. Kaaridinen, H. Lonnqvist, T. Sankila, R. Seersholm, N. Tretli, S. Yuen, J. Boice, J. and Tucker, M. 2001. Cancer in patients

with ataxia telangiectasia and in their relatives in the Nordic countries. J. Nat. Cancer Inst. 93: 121-127.

Parry, R. Glaze, S. and Archer, B. 1999. The AAPM/RSNA physics tutorial for residents. Imag. Therap. Tec. 19: 1289-1302.

Patel, K. Yu, V. Lee, H. Corcoran, A. Thistlethwaite, F. Evans, M. Colledge, W. Friedman, L. Ponder, B. and Venkitaraman, A. 1998. Involvement of BRCA2 in DNA repair. Mol. Cell 1: 347-357.

Paterson, M. Anderson, A. Smith, B. and Smith, P. 1979. Enhanced radiosensibility of cultured fibroblasts from ataxia telangiectasia heterozygotes manifested by defective colony forming ability and reduced DNA replication afther hypoxic y irradiation. Cancer Res. 39: 3725-3728.

Paz, C. Creus, A. y Leone, P. 2002. Genética Toxicológica y Carcinogénesis. Edición del laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana. BID-FUNDACYT-PUCE. Ecuador. 297 p.

Pierce, D. and Preston, D. 1996. Risks from low doses of radiation. Science 272: 632-633.

Pippard, E. Hall, A. Barker, D. and Bridgest, B. 1988. Cancer in homozygotes and heterozygotes of ataxia telangiectasia and xeroderma pigmentosum in Britain. Cancer Res. 48: 2929-2932.

Pollycove, M. and Maryland, B. 2001. Biologic responses to low doses of ionizing radiation: detriment versus hormesis. J. Med. USA. 42: 26-37.

Prasad, K., Cole, W. and Hasse, G. 2004. Health risks of low dose ionizing radiation in humans: A review. Exp. Biol. Med. 229: 378-382.

Preston, D. Shimizu, Y. Pierce, D. Suyama, A. and Mabuchi, K. 2003. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. Radiat. Res. 160: 381-407.

Rodríguez, A. 2003. Diseño, construcción y caracterización dosimétrica de un irradiador de bajas dosis para muestras biológicas. Tesís de Licenciatura en Física. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de ciencias. D.F-México. 86 p.

Rothkamm, K. and Lobrich, M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. NY-USA. PNAS. 100: 5057-5062.

Ruffner, H. et al. 1999. BRCA1 is phosphorylated at serine1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. Mol. Cell. Biol. 19: 4843–4854.

Salamanca, F. 1990. Citogenética Humana. Editorial Médica Panamericana S.A de C.V. D.F.-México: 400 p.

Savitsky, K. Bar-Shira, A. Gilad, S. Rotman, G. Ziv, Y. Vanagaite, L. Tagle, D. Smith, S. Uziel, T. Sfez, S. Ashkenasi, M. Pecker, I. Frydman, M. Harnick, R. Patanjali, S. Simmons, A. Clines, G. Sartiel, A. Gatti, R. Chessa, L. Ganal, O. Lavin, M. Jspers, N. Taylor, A. Arlett, C. Mili, T. Weissman, S. Lovett, M. Collins, F. and Shiloh, Y. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science 268: 1749–1753.

Scott, D. Barber, A. Spreadboroungh, A. Burrill, W. and Roberts, S. 1999. Increased chromosomal radiosensibility in breast cancer patients: a comparison of two assays, Int. J. Radiat. Biol. 75: 1-10.

Scott, P. Bendix, R. Chen, R. Clark, T. Dork, T. and Lavin, M. 2002. Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patient's whit breast cancer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 925-930.

Shiloh, Y. 1995. Ataxia-telangiectasia: closer to unraveling the mystery. Eur. J. Hum. Genet. 3: 116–138.

Shiloh Y. 1997. Ataxia telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart, Annu. Rev. Genet. 31: 635-662.

Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat. Rev. Cancer. 3:155-168.

Stankovic, T. Kidd, A. Sutcliffe, G. McGuire, P. Robison, P. Weber, T. Bradwell, D. Easton, G. Lennox, N. Haites, P. Byrd, A. and Taylor, P. 1998. ATM mutation and phenotypes in ataxia telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer, Am. J. Hum. Genet. 62: 334-345.

Stewart, G. Last, J. Stankovic, T. Haites, N. Kidd, A. Byrd, P. et al. 2001. Residual ataxia telangiectasia mutated protein function in cell from ataxia telangiectasia patients, with 5762ins137 and 7271T—G mutations, showing a less severe phenotype. J. Biol. Chem. 276: 30133-41.

Stewart, G. and Elledge, S. 2002. The Two Faces of BRCA2, a FANCtastic Discovery. Mol. Cell 10: 2-4.

Suntharalingam, N. Podgorsak, E. y Hendry, J. 2004. Basic Radiobiology. Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students. Editor Podgorsak, E. USA, pp. 397-412.

Swift, M. Sholman, L. Perry, M. and Chase, C. 1976. Malignant neoplasm in the families of patients whit ataxia telangiectasia. Cancer Res. 36: 209-215.

Swift, M. Morrell, D. Cromartie, E. et al. 1986. The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. Am J Hum Genet.; 39: 573–583.

Swift, M. Reitnauer, P. Morell, D. and Chase, CL. 1987. Breast and other cancer in families with ataxia telangiectasia. N. Engl. J. Med. 316:1289-1294.

Swift, M. Morrell, D. Cromartie, E. Massey, C. and Chase, L. 1991. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia telangiectasia. New Engl. J. Med. 325: 1831-1836.

Taylor A. 2001. Chromosome instability syndromes. Best Pract Res Clin Haematol. 3: 631-644.

Teraoka, S. Telatar, M. Becker-Catania, S. Liang, T. Onengut, S. Tolun, A. Chessa, L. Sanal, O. Bernatowska, E. Gatti, R. and Concannon, P. 1999. Splicing defects in the ataxia telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. Am. J. Genet. 64: 1617-1631.

Thierens, H. Vral, A, Barbe, M. Meijlaers, A. Baeyens, L. and De Ridder, A. 2002. Chromosomal radiosensibility study of temporary nuclear workers and the support of the adaptative response induced by occupational exposure, Int. J. Radiat. Biol. 78: 1117-1126.

Thorstenson, Y. Roxas, A. Kroiss, R. Jenkins, M. Yu, K. Bachrich, T. Muhr, D. Wayne, T. Chu, G. Davis, R. Wagner, T. and Oefner, P. 2003. Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. Cancer Res. 63: 3325-3333.

Turrence, G. Paul, P. and Laflair, B. 2001. Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. Oncogene 20: 5100-5110.

UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 1985. Sources and Effects of Ionizing Radiation: Report to the General Assembly, whit Scientific Annexes (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, New York).

UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 2000. Sources and Effects of Ionizing Radiation: Report to the General Assembly, whit Scientific Annexes (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, New York).

Venkitaraman, A. 2001. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. J. Cell Sci. 114: 3591-3598.

Vilenchik, M. and Knudson, A. 2000. Inverse radiation dose rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 5381-5386.

Vulpis, N. 1984. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by in vitro irradiation with \(\mathcal{G} \)-particles from tritiated water. Radiat. Res. 97: 511-518.

Welcsh, P. Owens, K. King, M. 2000. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. Trends Genet. 16: 69-74.

Widel, M. and Przybyszewski, W. 1998. Inverse dose rate effect for the induction of micronuclei in Lewis lung carcinoma after exposure to cobalt-60 gamma rays. Radiat. Res. 149: 98-102.

Wilson, J. and Elledge, S. 2002. BRCA2 enter the fray. Science. 279: 1822-1823.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Solución Fricke.

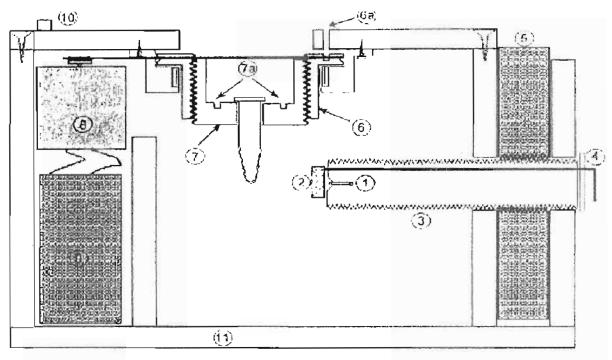
Reactivos:

Fe(NH₄)₂(SO₄) 0.196 g NaCl 0.03 g

Procedimiento:

Pesar y disolver los reactivos en 10 ml de H_2SO_4 (0.8 N). Aforar a un volumen de 500 ml utilizando H_2SO_4 (0.8 N).

Anexo 2. Esquema del Equipo de Irradiación.



1 Fuente radiactiva de ⁹⁰Sr-⁹⁰Y, 2 Obturaçor; 3 Terni o conce se encuentra alojeda la fuente radiactiva; 4 Manija del obturador; 5 Disco de nylon; 6 Tirenta del porta muestra; 7 Tornillo del porta muestra. 8 Motor; 9 Pilas; 10 Interruptor; 11 Parodos designadiados

Rodríguez, A. 2003.

Anexo 3. Tabla de dosis y tiempos de irradiación necesarios para cada una de las distancias de irradiación.

Dosis (mGy)	Distancia de irradiación (cm)						
	1.6	2	2.5	3	3.5	4	4.5
10	52 s	1 min 21 s	2 min 5 s	2 min 56 s	4 min	5 min 15 s	6 min 40 s
20	1 min 44 s	2 min 42 s	4 min 10 s	5 min 44 s	8 min	10 min 30 s	13 min 20 s
30	2 min 36 s	4 min 3 s	6 min 15 s	8 min 48 s	12 min	15 min 45 s	20 min
40	3 min 28 s	5 min 22 s	8 min 20 s	11 min 44 s	16 min	21 min	26 min 40 s
50	4 min 20 s	6 min 45 s	10 min 25 s	14 min 42 s	20 min	26 min 15 s	33 min 20 s
100	8 min 40 s	13 min 30 s	20 min 50 s	29 min 22 s	40 min	52 min 30 s	1 h 6 min
300	26 min	40 min 30 s	1 h 2 min	1 h 28 min	2 h	2 h 37 min	3 h 18 min
500	43 min 20 s	1 h 7 min	1 h 44 min	2 h 26 min	3 h 20 min	4 h 22 min	5 h 30 min
1000	1h 26 min	2 h 14 min	3 h 28 min	4 h 54 min	6 h 40 min	8 h 44 min	11 h
1500	2 h 33 s	3 h 21 min	4 h 32 min	7 h 11 min	10 h	13 h 6 min	16 h 30 min
2000	2 h 53 mín	4 h 28 min	6 h 56 min	9 h 48 min	13 h 20 min	17 h 28 min	22 h

Rodríguez, A. 2003.

Anexo 4. Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS).

Reactivos:

Procedimiento:

Pesar y aforar a un volumen de 500 ml utilizando agua mlQ. La mezcla debe tener el pH entre 7.2 y 7.5.